

JP 4501848

1/9/1

DIALOG(R)File 351: Derwent WPI

(c) 2007 The Thomson Corporation. All rights reserved.

0004818658 WPI Acc no: 1989-192552/198926

Related WPI Acc No: 1990-192953 XRAM Acc no: C1989-085222; C1990-083493

**Inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis - by admin. of D-phenyl-alanyl-prolyl-arginine halomethyl ketone cpds.**

Patent Assignee: SCRIPPS CLINIC & RE (SCRI); SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

Inventor: HANSON S R; HARKER L A

Patent Family ( 10 patents, 13 countries )

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
WO 1989005148	A	19890615	WO 1988US4210	A	19881123	198926	B
AU 198932864	A	19890705				198937	E
EP 343241	A	19891129	EP 1988903538	A	19881123	198948	E
US 4929602	A	19900529	US 1987125178	A	19871125	199025	E
			US 1988275330	A	19881122		
JP 4501848	W	19920402	JP 1989503265	A	19881123	199220	E
EP 343241	B1	19940216	WO 1988US4210	A	19881123	199407	E
			EP 1989903538	A	19881123		
DE 3887875	G	19940324	DE 3887875	A	19881123	199413	E
			WO 1988US4210	A	19881123		
			EP 1989903538	A	19881123		
EP 343241	A4	19910731	US 1988239761	A	19880902	199517	E
CA 1335075	C	19950404	CA 583982	A	19881124	199521	E
JP 2758953	B2	19980528	WO 1988US4210	A	19881123	199826	E
			JP 1989503265	A	19881123		

Priority Applications (no., kind, date): US 1987125178 A 19871125; US 1988275330 A 19881122

Patent Details						
Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes	
WO 1989005148	A	EN	65	8		
National Designated States,Original		AU JP				
Regional Designated States,Original		AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE				
EP 343241	A	EN				
Regional Designated States,Original		AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE				
US 4929602	A	EN	21	8		
JP 4501848	W	JA	16		Based on OPI patent	WO 1989005148
EP 343241	B1	EN	30		PCT Application	WO 1988US4210
					Based on OPI patent	WO 1989005148
Regional Designated States,Original		AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE				
DE 3887875	G	DE			PCT Application	WO 1988US4210
					Application	EP 1989903538
					Based on OPI patent	EP 343241
					Based on OPI patent	WO 1989005148
EP 343241	A4	EN				
CA 1335075	C	EN				
JP 2758953	B2	JA	19		PCT Application	WO 1988US4210
					Previously issued patent	JP 04501848
					Based on OPI patent	WO 1989005148

### Alerting Abstract WO A

Method of inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis comprises admin. of a peptide of formula (I) or hydrohalic acid addn salt. In (I), where Z = H or 1-6C acyl, pref H; and X = halogen, pref. Cl; i.e. D-Phe-Pro-Arg-haloalkyl ketone and N-acyl derivs.

USE/ADVANTAGE - Partic. useful for inhibiting post-therapeutic arterial restonosis and platelet deposition on prosthetic surfaces (both claimed), e.g. in endarterectomy or angioplasty or installation of arterial prostheses or arteriovenous shunts. Doses are such as to give a concn. of (I) of at least 0.2, pref. at least 1 mcg/ml in blood flowing in treated arteries or past the prosthetic surface, for a time of at least 5 min., pref. 5-90 min.

Diseases in which platelet dependent arterial thrombosis plays a role and which may be managed with (I) include cerebrovascular atherosclerotic disease (stroke or transient cerebral ischemia), coronary atherosclerotic disease (cardiac ischemia, unstable angina or acute myocardial infarction), and peripheral arterial occlusive disease (distal ischemia),

etc. (I) may be used in conjunction with a thrombolytic agent (urokinase, streptokinase, tPA).

#### Equivalent Alerting Abstract US A

Method of inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis, arterial restenosis or platelet deposition on an arterial prosthetic surface comprises admin. of a peptide of formula (I) or hydrohalic acid addn. prods.; where Z = H or 1-6C acyl; and X = halogen. Pref. Z = H and X = Cl, i.e. D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl.

USE/ADVANTAGE - Useful in treatment of cerebrovascular atherosclerotic disease, e.g. stroke or transient cerebral ischemia, coronary atherosclerotic disease, e.g. cardiac ischemia, unstable angina or acute myocardial infarction, peripheral arterial occlusive disease, e.g. distal ischemia, etc. for inhibiting restenosis following e.g. endarterectomy, angioplasty, arterial vascular prosthesis insertion or treatment with thrombolytic agent (e.g. streptokinase, urokinase or tPA); and for inhibiting platelet deposition on arterial prostheses, e.g. grafts, arterial stents, A-V shunts, cardiopulmonary assist devices, etc. Doses are sufficient to give a concn. in the blood of at least 0.2, esp. at least 1 mcg/ml, pref. for at least 5 mins., esp. 5-90 mins.

**Title Terms /Index Terms/Additional Words:** INHIBIT; PLATELET; DEPEND; ARTERY; THROMBOSIS; ADMINISTER; PHENYL; ALANYL; PROLYL; ARGININE; HALOMETHYL; KETONE; COMPOUND

#### Class Codes

International Patent Classification

IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
A61K-037/02		Main			"Version 7"
A61K-037/02		Secondary			"Version 7"
A61K-0038/00	A	I	F	R	20060101
A61K-0038/06	A	I		R	20060101
A61K-0038/46	A	I	L	R	20060101
A61P-0007/02	A	I	L	R	20060101
A61P-0009/10	A	I	L	R	20060101
C07K-0005/08	A	I		R	20060101
A61K-0038/00	C	I	F	R	20060101
A61K-0038/06	C	I		R	20060101
A61K-0038/43	C	I	L	R	20060101
A61P-0007/00	C	I	L	R	20060101
A61P-0009/00	C	I	L	R	20060101
C07K-0005/00	C	I		R	20060101

US Classification, Issued: 514018000, 530331000

File Segment: CPI; EngPI

DWPI Class: B03; P34

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01A; B07-D03; B12-C10; B12-F01B; B12-F02; B12-H02

### **Chemical Indexing**

Chemical Fragment Codes (M2) :

\*01\* M903 M904 F011 F012 F423 G100 H100 H181 H2 H211 H6 H600 H602 H603  
H604 H681 J0 J012 J013 J3 J311 J371 J5 J581 K0 L2 L250 M210 M211 M212  
M213 M214 M215 M231 M232 M233 M262 M280 M281 M311 M312 M314 M321 M332  
M342 M343 M349 M362 M371 M381 M391 M413 M510 M521 M531 M540 M640 M650  
M781 P448 P522 P523 P813 P814 8926-34901-U 129798-X 131652-X 131663-X  
63-X 7-X 80-X 9-X

Generic (Markush) Compound Numbers: 8926-34901-U

Derwent Chemistry Resource Numbers: (Linked) 129798-X; 131652-X; 131663-X; 63-X; 7-X; 80-X; 9-X; 129798-REM; 131652-REM; 131663-REM; 63-REM; 7-REM; 80-REM; 9-REM

Key Word Indexing

\*1\* 129798-REM 131652-REM 131663-REM 63-REM 7-REM 80-REM 9-REM

### **Original Publication Data by Authority**

#### **Australia**

**Publication No.** AU 198932864 A (Update 198937 E)

**Publication Date:** 19890705

**Language:** EN

**Priority:** US 1987125178 A 19871125

**Current IPC:** C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051206,C) C07K-5/08(R,I,M,EP,20060101,20051206,A)

#### **Canada**

**Publication No.** CA 1335075 C (Update 199521 E)

**Publication Date:** 19950404

**Assignee:** SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

**Inventor:** HARKER L A

HANSON S R

**Language:** EN

**Application:** CA 583982 A 19881124 (Local application)

**Priority:** US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

**Original IPC:** A61K-37/64(A) A61K-37/02(B) A61K-37/54(B) A61L-33/00(B)

**Current IPC:** A61K-38/00(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-  
38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-  
7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)  
A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-  
9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

## **Germany**

**Publication No.** DE 3887875 G (Update 199413 E)

Publication Date: 19940324

Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

Inventor: HARKER L A

HANSON S R

Language: DE

Application: DE 3887875 A 19881123 (Local application)

WO 1988US4210 A 19881123 (PCT Application)

EP 1989903538 A 19881123 (Application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

Related Publication: EP 343241 A (Based on OPI patent )

WO 1989005148 A (Based on OPI patent )

Original IPC: A61K-37/02(A) C07K-5/08(B)

Current IPC: A61K-37/02(A) C07K-5/08(B)

## **EPO**

**Publication No.** EP 343241 A (Update 198948 E)

Publication Date: 19891129

**VERFAHREN ZUR VORBEUGUNG EINER VON BLUTPLATTCHEN**

**ABHANGIGEN GEFASTHROMBOSE**

**A METHOD OF INHIBITING PLATELET DEPENDENT ARTERIAL  
THROMBOSIS**

**PROCEDE INHIBANT LA THROMBOSE ARTERIELLE DUE AUX  
PLAQUETTES**

Assignee: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla California 92037, US (SCRI)

Inventor: HARKER, Laurence, A., 3498 Lady Hill Road, San Diego, CA 92130, US  
HANSON, Stephen, R., 201 Meadow Vista Lane, Encinitas, CA 92024, US

Agent: Fisher, Adrian John et al, CARPMAELS & RANSFORD 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA, GB

Language: EN

Application: EP 1988903538 A 19881123 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Original IPC: A61K-37/02 C07K-5/08

Current IPC: A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-  
38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)  
A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-  
38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-  
7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)  
A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-  
9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

**Original Abstract:**

The present invention contemplates a method of preventing platelet dependent arterial thrombosis using a halogen-methyl ketone-containing peptide represented by formula (I), or a hydrohalic addition product thereof. More particularly, the present invention provides improved methods for inhibiting arterial restenosis, hemodialysis and the like.

**Claim:** Method of inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis comprises admin. of a peptide of formula (I) or hydrohalic acid addn salt. In (I), where Z = H or 1-6C acyl, pref H; and X = halogen, pref. Cl; i.e. D-Phe-Pro-Arg-haloalkyl ketone and N-acyl derivs.

**Publication No.** EP 343241 A4 (Update 199517 E)

Publication Date: 19910731

Assignee: SCRIPPS CLINIC & RE (SCRI)

Inventor: HARKER L A

HANSON S R

Language: EN

Application: EP 1988903538 A 19881123 (Local application)

Original IPC: A61K-37/02(B) C07K-5/08(B)

Current IPC: A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-  
38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-  
38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)  
A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-  
38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-  
7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)  
A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-  
9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

**Publication No.** EP 343241 B1 (Update 199407 E)

Publication Date: 19940216

**VERFAHREN ZUR VORBEUGUNG EINER VON BLUTPLATTCHEN  
ABHANGIGEN GEFASSTHROMBOSE**

**A METHOD OF INHIBITING PLATELET DEPENDENT ARTERIAL  
THROMBOSIS**

**PROCEDE INHIBANT LA THROMBOSE ARTERIELLE DUE AUX  
PLAQUETTES**

Assignee: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla California 92037, US (SCRI)

Inventor: HARKER, Laurence, A., 3498 Lady Hill Road, San Diego, CA 92130, US  
HANSON, Stephen, R., 201 Meadow Vista Lane, Encinitas, CA 92024, US

Agent: Fisher, Adrian John et al, CARPMAELS & RANSFORD 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA, GB

Language: EN (30 pages)

Application: WO 1988US4210 A 19881123 (PCT Application)

EP 1989903538 A 19881123 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

Related Publication: WO 1989005148 A (Based on OPI patent )

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Original IPC: A61K-37/02(A) C07K-5/08(B)

Current IPC: A61K-38/00(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-

38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-

38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-

7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-

9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Claim:

- 1. Die Verwendung des Peptides der Formel 1,[0060.0001]  
worin Z Wasserstoff oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Acylgruppe und X ein Halogenatom darstellt, oder eines Additionsprodukts davon mit einer Halogenwasserstoffsaeure zur Herstellung eines Medikaments zum Hemmen von Blutplaettchen-abhaengiger Thrombusbildung, Arterienverengung oder Blutplaettchenablagerung auf einem prosthetischen Gegenstand.
- 1. The use of a peptide of Formula 1[0056.0001]  
wherein Z is hydrogen or a C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> acyl and X is a halogen atom, or a hydrohalic acid addition product thereof, in the manufacture of a medicament for inhibiting platelet dependent arterial thrombosis, arterial restenosis or platelet deposition on an arterial prosthetic device.

## Japan

Publication No. JP 4501848 W (Update 199220 E)

Publication Date: 19920402

Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

Language: JA (16 pages)

Application: JP 1989503265 A 19881123 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

Related Publication: WO 1989005148 A (Based on OPI patent )

Original IPC: A61K-37/02(B)

Current IPC: A61K-37/02(B)

Publication No. JP 2758953 B2 (Update 199826 E)

Publication Date: 19980528  
Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)  
Inventor: HARKER L A  
HANSON S R  
Language: JA (19 pages)  
Application: WO 1988US4210 A 19881123 (PCT Application)  
JP 1989503265 A 19881123 (Local application)  
Priority: US 1987125178 A 19871125  
US 1988275330 A 19881122  
Related Publication: JP 04501848 A (Previously issued patent)  
WO 1989005148 A (Based on OPI patent )  
Original IPC: A61K-38/00(A) A61K-38/46(B)  
Current IPC: A61K-38/00(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20050101,C,L) A61P-9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

## United States

**Publication No.** US 4929602 A (Update 199025 E)  
**Publication Date:** 19900529  
**Method of inhibiting platelet dependent arterial thrombosis**  
Assignee: Scripps Clinic and Research Foundation (SCRI)  
Inventor: Harker, Laurence A., CA, US  
Hanson, Stephen R.  
Agent: Dressler, Goldsmith, Shore, Sutker & Milnamow, Ltd.  
Language: EN (21 pages, 8 drawings)  
Application: US 1987125178 A 19871125  
US 1988275330 A 19881122 (Local application)  
Original IPC: A61K-37/02 C07K-5/08  
Current IPC: A61K-37/02 C07K-5/08  
Original US Class (main): 51418  
Original US Class (secondary): 530331  
Original Abstract:  
The present invention contemplates a method of preventing platelet dependent arterial thrombosis using a halogen-methyl ketone-containing peptide represented by Formula (1) as shown in FIG. 1, or a hydrohalic addition product thereof. More particularly, the present invention provides improved methods for inhibiting arterial restenosis, hemodialysis and the like.

WIPO

**Publication No.** WO 1989005148 A (Update 198926 B)

**Publication Date:** 19890615

**A METHOD OF INHIBITING PLATELET DEPENDENT ARTERIAL THROMBOSIS**

**Assignee:** SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, US (SCRI)

**Inventor:** HARKER, LAURENCE, A., US

HANSON, STEPHEN, R., US

**Language:** EN (65 pages, 8 drawings)

**Application:** WO 1988US4210 A 19881123 (Local application)

**Priority:** US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

**Designated States:** (National Original) AU JP

(Regional Original) AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

**Original IPC:** A61K-37/02 C07K-5/08

**Current IPC:** A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

**Original Abstract:**

The present invention contemplates a method of preventing platelet dependent arterial thrombosis using a halogen-methyl ketone-containing peptide represented by formula (I), or a hydrohalic addition product thereof. More particularly, the present invention provides improved methods for inhibiting arterial restenosis, hemodialysis and the like.

## ⑫ 公表特許公報 (A)

平4-501848

⑬ 公表 平成4年(1992)4月2日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 37/02  
37/54識別記号  
ABX  
ACB庁内整理番号  
8317-4C  
8317-4C審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求  
部門(区分) 3(2)

(全16頁)

⑤ 発明の名称 血小板依存性動脈血栓症の予防方法

⑥ 特 願 平1-503265

⑦ ⑧ 出 願 昭63(1988)11月23日

⑨ 翻訳文提出日 平1(1989)7月25日

⑩ 國際出願 PCT/US88/04210

⑪ 國際公開番号 WO89/05148

⑫ 國際公開日 平1(1989)6月15日

優先権主張 ⑬ 1987年11月25日④米国(U S)⑤125,178

⑬ 発明者 ハーカー ローレンス エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92130 サン デイエゴ レ  
デイー ヒル ロード 3498⑭ 出願人 スクリップス クリニツク ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース  
ンド リサーチ ファウンデー トリー バインズ ロード 10666  
ション

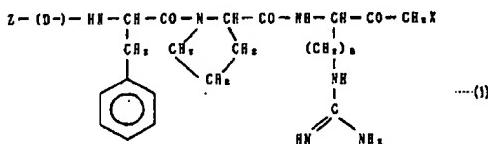
⑮ 代理人 弁理士 中村 稔 外7名

⑯ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特  
許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

最終頁に統く

## 請求の範囲

(1) 患者における血小板依存性動脈血栓症を予防する方法において、該患者に対する治療上有効な量の式(I)で表わされるペプチド又はそのハロゲン酸付加生成物の投与を含む方法

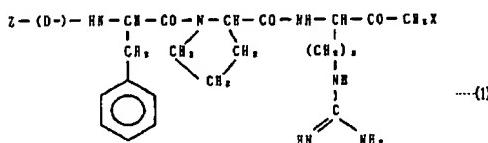


(式中、Zは水素若しくはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル基を示し；Xはハロゲン原子を示す)。

(2) 請求の範囲第1項記載の方法において、Xが塩素を示し、Zが水素を示す方法。

(3) 患者における動脈再狭窄症を予防する方法において、以下の(a), (b)及び(c)：

(a) 該患者に対する治療上有効な量の式(I)で表わされるペプチド又はそのハロゲン酸付加生成物の投与



(式中、Zは水素若しくはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル基を示し；Xはハロゲン原子を示す)。

(b) 該患者に対する狭窄動脈内の血管管直徑を増大させ、それ

により動脈動脈を作成するための医療処置の実施、及び

(c) 該患者の動脈血の旗動脈中の循環を含む方法。

(4) 請求の範囲第3項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも0.2μg/mlの該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

(5) 請求の範囲第3項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも1μg/mlの該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

(6) 請求の範囲第5項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間該ペプチド濃度を維持するのに十分である方法。

(7) 請求の範囲第5項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間以上で90分間以下の間該血中濃度を維持するのに十分である方法。

(8) 請求の範囲第3項記載の方法において、Xが塩素を示し、Zが水素を示す方法。

(9) 請求の範囲第3項記載の方法において、該医療処置が外科処置である方法。

(10) 請求の範囲第9項記載の方法において、該外科処置が動脈内膜切除術若しくは血管形成術である方法。

(11) 請求の範囲第3項記載の方法において、該医療処置が該患者に対する医療上有効な量の血栓溶解剤の投与を含む方法。

(12) 請求の範囲第11項記載の方法において、該血栓溶解剤がストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ若しくは組織プラスミノーゲン活性化剤である方法。

(13) 請求の範囲第13項記載の方法において、(a)が(c)より先に行なわれる方法。

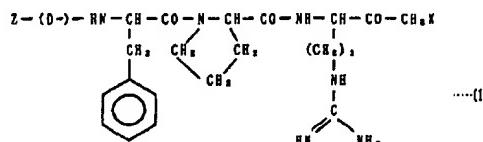
特表平4-501848(2)

44 請求の範囲第13項記載の方法において、該血中の該ペプチド濃度が少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に(4)が行なわれる方法。

(4) 請求の範囲第13項記載の方法において、(4)が行なわれた後5分以内に(4)が行なわれる方法。

45 患者における動脈管表面の血小板沈着を予防する方法において、以下の(4)及び(5)：

(4) 該患者に対する治療上有効な量の式(I)で表わされるペプチド及びそのハロゲン酸付加生成物の投与



(式中、Zは水素若しくはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル基を示し；

Xはハロゲン原子を示す)、

(5) 該患者の動脈血の補綴表面上の循環を含む方法。

46 請求の範囲第16項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

47 請求の範囲第16項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

48 請求の範囲第18項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間該ペプチド濃度を維持するのに十分である方法。

49 請求の範囲第18項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間以上で90分以下の間該血中濃度を維持するのに十分である方法。

(21) 請求の範囲第16項記載の方法において、Xが塩素を示し、Zが水素を示す方法。

(22) 請求の範囲第16項記載の方法において、該血栓形成性表面が動脈管若しくは動脈吻合である方法。

(23) 請求の範囲第16項記載の方法において、(4)が(4)より先に行なわれる方法。

(24) 請求の範囲第23項記載の方法において、該血中の該ペプチド濃度が少なくとも $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に(4)が行なわれる方法。

### 血小板依存性動脈血栓症の予防方法

#### 明細書

##### 発明関連出願

本件は、その開示が参考文献として本文中に組み込まれている、1987年11月27日出願に係る第125,178号の一部係属出願である。

##### 技術分野

本発明は動脈血栓症の危険のある患者における血小板凝集を予防するためのハロゲン-メチルケトン含有ペプチドの使用に関する。

##### 発明の背景

血栓は血栓形成性刺激への反応として生じた心臓若しくは血管中に血液構成要素から形成される成分の集合体である。

血栓症、すなわち血栓形成過程は独特であるが通常相互作用的なメカニズムを通じて発生しうる。第一段階、すなわち血小板凝集は血小板が血管壁損傷等の血栓形成性刺激により活性化された結果として起きる。第二段階、すなわちフィブリノーゲン形成は凝血連鎖系の活性化の結果であり、その最終段階が通常トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリノーへの転化、すなわちフィブリノーゲン形成と考えられている。フィブリノーゲン形成の目的は凝集血小板を安定化させることにより止血プラグ(Plug)を安定化させることであると思われる。

血小板凝集及びフィブリノーゲン形成の間との強度若しくは程度は、血行力学(血流)因子の結果として変化することが今では知られている。たとえば、静脈血栓症は低流速条件下で発生し、血小板及び凝血連鎖系成分の合図かつ等量の消費を伴なうことが示されている(ハーカーら、ニューイングランドジャーナル オブ メディスン、287巻、第999-1005頁、1972年)。

結果として、静脈血栓は通常比較的少數の凝集血小板、多量の敗在フィブリノーゲン及び幾つかの赤血球細胞から成る非組織化塊であり、このため“赤色血栓”と呼ばれる。フライマン・止血と血栓症：基本原理と臨床的実験、コールマンら編、第2版、フィラデルフィア、J. B. リッピンコット社、第1123-35頁(1987年)を参照のこと。これらの観察はフィブリノーゲン形成が静脈血栓の発生において主役を演じることを示唆している。

対照的に、動脈血栓症は高流速条件下で発生し、少なくともその初期の段階で、血小板の過剰の消費を伴なうことが示されている(ハーカーら、ニューイングランドジャーナル オブ メディスン、287巻、第999-1005頁、1972年)。例として、動物実験はプラスチック動脈カニューレの補綴表面は完全に血小板だけから成る血栓を発生させ、その血栓形成過程は検出可能な凝血連鎖系の関与なしに進行することを示している(エバンスら、ジャーナル オブ エクスペリメンタルメディスン、128巻、第877-894頁、1968年、及びハーカーら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション、第64巻、第559-589頁、1979年)。おそらく、凝血作用が十分に活性化される前にトロンビン等の凝血促進物質が急速な動脈血流によって血栓形成拠点から洗い流されてしまうために、動脈血栓症においてはフィブリノーゲン形成は極少量である。結果として、動脈血栓は通常、完全に血小板だけから成る(“白色血栓”)か、若しくは血小板による基底あるいは一次塊及び、一次塊上を覆いそこから下流方向へ伸張する血小板及びフィブリノーゲンによる二次塊から成る複合構造から成る。前述のフライマンの引用文献を参照のこと。いずれの場合も、損傷部における血小板凝集は動脈

### 特表平4-501848 (3)

血栓発現の主要なメカニズムである。それゆえ、動脈血栓症は少なくともその初期の段階では、血小板依存性と特徴付けることができる（ハーカーら、『原書系疾患：最新の研究と臨床応用』ストラッテンスラ編、オーランド、グラン アンド ストラットン、第271-283頁、1987年）。

前述の視点から、血小板凝集若しくはフィブリン形成のいずれかに作用する薬剤の治療上の有効性が処置される血栓症の型に依存することが知られているのは驚くべきことではない。

例えば、アスピリン若しくはジビリダモール等の血小板機能を阻害する、すなわち血小板の凝集能を阻害する薬剤は、動脈血栓症の予防において有効であるが、うっ血型静脈血栓症の治療においては有効でない。逆に、ヘパリン及びヒルジン等のトロンビンのフィブリン形成能を阻害する薬剤は、うっ血型静脈血栓症に対しては治療上有効であるが、動脈血栓症に対しては有効でないことが示されている（ハーカーら、トロソバス アンド ダイアセティック ヘモリジ（*Throm. Diath. Haemorrh.*）31巻、第188-203頁、1974年）。

このように、本技術分野は動脈血栓症の効果的な管理においては、フィブリン形成ではなく血小板凝集の調節に力点が置かれるべきであることを教えるものである。すなわち、血小板依存性動脈血栓症を治療上有効に予防するには、前述のフィブリン形成を阻害する薬剤（抗凝血剤）ではなく、血小板の凝集能を阻害する薬剤（血小板機能阻害剤）の投与が必要である。理想的には、臨床上有用な血小板機能阻害薬は毒性がなく、持続性作用を持ち、異常出血の過剰リスクなしに良好な抗血栓能をもつべきである。現在使用できる臨床薬剤のいずれも、これらの要求のすべてを満足してはいない。アスピリン、スルフィンピラゾン、ジビリダモ

ール、スロクテジル及びチクロビジンが現在までに臨床試験による評価を受けている薬剤である。

血小板依存性動脈血栓症を予防する能力のある薬剤の開発における困難のひとつは、アデノシンニリン酸（ADP）、コラーゲン、トロンビン、トロンボキサンA<sub>2</sub>、エピネフリン、セロトニン、バソプレシン、抗原-抗体複合体、プラスミン、ウィルス、バクテリア、エンドトキシン及び細胞を含む多様な刺激によって血小板の凝集が誘導されることである。本技術分野によれば、インピボ (*in vivo*) ではいかなる單独の刺激剤の局所濃度もおそらく凝集を発生させるのに十分なほど高くはないらしい。結果として、インピボでは、いくつかの刺激が共同作用的効果を伴なって同時に血小板に作用するため、その刺激の個々については非常に低濃度で凝集の誘導に対して有効であるらしい。バッカム、トロンボシス アンド ヘモスタシス（*Thromb. Haemostas.*）50巻、第610-619頁（1983年）を参照のこと。

このように、本技術分野では特定の血小板凝集誘導剤を押さえることが、血小板依存性動脈血栓症の予防に対する有効なアプローチにならないと思われることを示唆している。いくつかの研究が、この視点を支持しており、そのうち最も関連のあるものはトロンビンの酵素活性ではなく、トロンビンの体液活性、すなわちその血小板活性化刺激能を調べた研究である。たとえば、既知の抗凝血剤であるヘパリン及びヒルジンはインピトロ (*in vitro*) でトロンビンの血小板凝集誘導能を阻害することも示されている（マークワードら、ヘモスタシス、13巻、第221-233頁、1983年、及びホフマンら、ヘモスタシス、14巻、第164-169頁、1984年）。もっとも、ヘパリン若しくはヒルジンのいずれもインピボでの動脈血栓症の予防においては

有効でなく、このことはトロンビン以外の1個以上の刺激がインピボの動脈内血小板凝集の誘導の原因であることを示唆している。

本発明で特に重要性を持つものは、D-フェニルアラニル-L-アラゴニル-L-アルギニル-L-クロロメチルケトン（D-Phe-Pro-Arg-Ch<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>若しくはPPACK）であるトリペプチド誘導体である（ケトナーら、トロンボシス リサーチ（*Thromb. Res.*）、14巻、第959-973頁、1979年、及び米国特許第4,318,904号、1982年3月9日、ショーラ）。PPACKはトロンビンの酵素活性を、その活性部位付近のヒスチジン残基をヘパリン-抗トロンビンIII複合体及びトロンビン間のそれと同等の結合度定数（ $1.1 \times 10^7$  L/mol/秒）でアルキル化することにより、非可逆的に阻害する。

ヘパリン及びヒルジンと同様に、PPACKはインピボでトロンビンの、血漿フィブリノーゲンをフィブリンに転化し、それにより、赤色血栓の形成を誘導する能力を阻害することが示されている。ケトナーら、トロンボシス リサーチ、14巻、第959-973頁、1979年、参照のこと。しかしながら、引用した各実験に記されているような注射によりもたらされる局所的に非常に高い濃度のトロンビンは、いかなる自然の血栓症過程においてもおそらく発生しないことは既記しておくべきである。さらに、それらの実験の方法論は、報告されている実験条件下での血栓症の発生におけるトロンビンの酵素活性及び体液活性の相対的寄与を描写させない。このように、それらの実験は、PPACKの動脈血栓症に及ぼす影響についての結論を引き出すのに適当なモデルを用いていなかった。

PPACKのフィブリン形成を予防する能力は、ヒトの血漿中及び実験動物の血液中で急速に減退することが示されている。た

とえば、コレンら、ジャーナル オブ ラボラトリーアンド クリニカルメディスン、99巻、第76-83頁、1982年、はウサギにおけるPPACKのフィブリン形成阻害能の半減期は約2.9分であると報告した。ハウプトマンら、トロンボシスリサーチ、20巻、第347-351頁、1980年、も同様に参照のこと。

ウサギの血漿におけるPPACKのフィブリン形成阻害能の半減期が相対的に短いため、前述のコレンらはPPACKの抗凝血効果をより長い期間持続させるには連続的注入が必要であろうと結論した。さらに、コレンらはPPACKの短かい血漿半減期から、PPACKは散在性血管内漏血が疑われるある種の緊急条件において特に有効と思われるとしている。彼らの推論は、PPACKの単回注射はただちにトロンビンの酵素活性を阻害するらしいが、そのフィブリン形成阻害能は急速に減退するらしいため長期間の抗凝血効果はもたらされないと想定したものであった。

マークワード、アニユアル ニューヨーク アカデミック サイエンス、485巻、第204-214頁、1986年、はPPACKの相対的に短かい半減期はそれがトロンビンだけでなく、アミノ基若しくはチオール基を含有する他の血液及び組織成分とも安定な共有結合を形成することができるためであると報告している。マークワードによれば、その性質がPPACKを抗凝血剤としてのインピボでの使用に不適当たらしめている。ハウプトマンら、トロンボシスリサーチ、20巻、第347-351頁、1980年、も参照のこと。

インピトロでのヘパリン様抗凝血剤としてのPPACKの使用の記述については、モーラーら、トロンボシス アンド ヘモ

タシス (Thromb. Haemostas.) 、55巻、第160-164頁、1986年；ボウドー、バックス サングイモーター (Vox Sang.) 、61巻、第192-196頁、1986年；ティーフェンブルンラ、サー キュレーション、73巻、第1291-1299頁、(1986年)ク (Ku) 、ジャーナル オブ カルディアック ファーマコロジ (J. Car. Pharm.) 、8巻、第29-35頁、1986年；オフェスラ、アニュアル ニューヨーク アカデミック サイエンス、485巻、第41-55頁、1986年；及びスカーファーら、ジャーナル オブ ラボラトリ アンド クリニカル メディスン、107巻、第488-497頁、1986年、を参照のこと。

またヘパリン及びヒルジンと同様に、PPACKはインピトロでトロンビンの血小板活性化刺激能を阻害することが示されている。ハーモンラ、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリィ、261巻、第15928-33頁、1986年；ハーモンラ、アニュアル ニューヨーク アカデミック サイエンス、485巻、第387-395頁、1986年；及びマークワードら、ヘモスタシス、13巻、第228-233頁、1983年、を参照のこと。もっとも、それらの各実験はクエン酸処理した血小板を人工培地で使用して行なわれた。パッカム、トロンボシス アンド ヘモスタシス (Thromb. Haemostas.) 、50巻、第810-819頁、1983年、によればそのような培地中におけるヒト血小板の反応は生理的濃度のイオン化カルシウムが存在する培地中におけるそれとは異なる。このように、パッカムによれば、血小板機能阻害剤について多くの実験は実はイオン化カルシウムが低濃度の培地中における間隔の詰まった血小板の接触により起きる。アラキドン酸経路の人工的刺激に対する阻害につ

いての実験であった。PPACKのインピトロでの血小板凝集阻害についての実験から結論を引き出すことは、それゆえ困難である。

今までインピトロでの血小板凝集に対するPPACKの作用若しくはそれの動脈血栓症予防能についての研究はなされていない。このことは、トロンビンの酵素活性だけでなく、その血小板凝集抑制能も阻害するヘパリン等の薬剤が動脈血栓症の予防においては有効でないという上記考案の教訓からすれば驚くに価しない。

#### 本発明の簡単な要約

本発明は患者における血小板依存性動脈血栓症を予防する方法において、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチドを投与することを含む方法に関する。

他の態様においては、本発明は患者における治療後動脈再狭窄症を予防する方法で、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチドを投与すること、該患者に狭窄した動脈中の血流管直径を増大させ処置動脈を作成するための治療過程を施すこと、及び該患者の動脈血を該処置動脈中に循環させることを含む方法に関する。

本発明はまた患者の補綴表面における血小板沈着を予防する方法で、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチドを投与すること、及び該患者の動脈血を補綴表面上に循環させることを含む方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

本開示の一部をなす図面において：

第1図は式(1)、すなわちハロゲン-メチルケトン含有ペプチドを表わす式において、式中Xがハロゲン原子、好ましくは塩素若しくは臭素を示し、Zが水素若しくはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル基、好

ましくは水素を示す式を具体的に表わしている。記号(D-)はフェニルアラニン残基が右旋性であることを示しており、一方残アラニン及びアルギニン残基は両方とも左旋性の配置を持つ。

第2図は式(2)、すなわち式(1)において式中Xが塩素を示しZが水素を示す、好ましいハロゲン-メチルケトン含有ペプチドであるPPACKの式を具体的に表わしている。

第3図は、ヒトにおける動脈移殖片への血小板沈着を阻害する能力についてPPACKとヘパリンを比較した実験を具体的に表わした2バネルを含んでいる。

これらの実験では自己由来の血小板を<sup>14</sup>I-ヨウオキシドでラベルした。その後長さ5mmの内径4.0mmのニットのダクロン血管移植片 (V.S. ガーテル社からの寄贈品) を長期休外転位の大鼠部動脈シラスティックシャント (物合) 中に伸張片として挿入した。該シャント内の血流量をカフス (cuff) ドップラー探査器針を用いて測定し、175±16ml/minの平均値を得た。血管移植片上の<sup>14</sup>I-ヨウ血小板沈着を映像分析システム (医療データシステムA:、メドトロニック) と連絡したガンマカメラ映像装置 (ダイナカメラ、ピッカー社) によって測定した。結果は、沈着した血小板の放射能を1mlあたりの循環血液の放射能で割り、1mlあたりの循環血小板数を掛けることにより得られる沈着血小板で表わした。該測定回数は括弧内に示してあり、誤差標準は平均値±1標準偏差 (one standard deviation) を表示している。

バネルAは非薬剤処置の対照動物において、<sup>14</sup>I-ヨウ血小板が急速にダクロン血管移植片に沈着し、50分後までに約10<sup>10</sup>血小板のブラー (安定期) 値に達したこと具体的に示している。該移植片は1.2±0.2時間で閉塞した。水平方向の斜線棒で示される60分間の100nmol/kg/minの速度でのPPACKの

連続的静脈内注入は血小板沈着を十分に阻害し、移殖片の閉塞を予防した。血小板依存性動脈血栓形成の回数は、該接座標上の約90分の位置より後の血小板沈着の増加によって明らかのように、PPACK投与停止の30分後に発現する。

バネルBは、該ヒトに体重1キログラム (kg)あたり100ユニット (U) のヘパリン投与 (総血栓凝固時間を3倍延長させる用量) が、60分間の投与時間にわたって該移植片への血小板沈着を有意には減少させなかったことを具体的に表わしている。バネルBはまた該ヒトへの1000ユニット/kgの投与が該移植片上の血小板沈着を極一部しか阻害しなかったことを具体的に表わしている。

第4図は頸動脈内膜切除部位におけるPPACKの動脈再狭窄 (<sup>14</sup>I-ヨウ-血小板沈着) 図を具体的に表わしている。垂直棒線は平均値±1標準偏差を表示している。非薬剤処置の対照実験 (●) における、該処置動脈内の動脈循環の開始後90分間の急性血小板沈着をバネルAに示す。バネルAに示された値は移植標準値を用いて組織希釈について補正されたため、該結果は沈着血小板数で表わされている。

PPACK (○) を該処置動脈内の動脈循環を開始する直前から100nmol/kg/minの速度で静脈内投与した際に得られた結果もバネルAに示す。

バネルBでは、該動脈内膜切取部位の<sup>14</sup>I-ヨウ血小板沈着を実施例1に記述した方法で得た動脈内膜切取/血液比で表わしている。バネルBより、対照 (●) 及びPPACK処置 (○) 条件下の両方で<sup>14</sup>I-ヨウ血小板の漸進的な蓄積は甚少なかったことがわかる。

第5図は、ヘパリン (●) と比較してPPACK (○) の、直

小板沈着の結果としての血液透析器内の容量損失若しくは該透析器の補綴表面における容量損失を防ぐ能力を具体的に表わしている。垂直棒線は平均値±標準偏差を表示している。

第6図は頸動脈内膜切除処置を具体的に表わしている。該頸動脈をクランプで締めた後、遠位を横に切開する。該近位断片を曲ビンセットで逆に引っぱって裏返す。固定結合を付け、マイクロサージュリー法を用いて1cmの区間に内膜切除術を施す。該血管をその通常の配置に戻し、末梢-末端吻合術を施す。正常内膜の断片が該内膜切除部位と該吻合部位の間に介在する。

第7図はPPACKの頸動脈内膜切除部位での血小板沈着阻害能を具体的に表わす2パネルを含む。非薬剤処置動物では頸動脈内膜切除部位への血小板沈着は急速に増加し、60~90分でプラトーに達する。100nmol/100mlのPPACKの60分間静脈内注入の処置をうけた動物では、血小板沈着は著しく減少する。本作用は先の術後即時(左)及び、血小板内膜切除対血液比から明らかのように3日間を経て(右)観察される。垂直棒線は平均値付近の分散を±1標準偏差で表示している。該対照と処置群の間の比較は両側スチューデントt-検定で行なった。

第8図は第5図と同様にヘパリンと比較した際の、該透析器内の血栓形成に対する各使用後の別個の測定値により、継推束(血液透析器)中の容量損失及び111In-血小板沈着を阻害するPPACKの能力を具体的に表わしている。ヘパリン処置動物は全試験時間において、有意かつ漸進的なDFVの損失及び継推束内の血小板蓄積の相反的増加を示した。対照するに、該PPACK処置はDFVを保ち、透析器中の血小板蓄積を著しく減少させた。

#### 本発明の詳細な説明

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル基を示し、Xはハロゲン原子を示す)で表わされるハロゲン-メチルケトン含有ペプチド及びそのハロゲン酸付加生成物についての新規使用法に関する。

好みのハロゲン-メチルケトン含有ペプチドは図2で示される式(2)(式中、Zは水素を示し、Xは塩素を示す)で表わされ、ここではPPACKと呼ぶ。

ハロゲン原子には好みの塩素、臭素若しくはヨウ素を含む。式(1)で表わされるハロゲン-メチルケトン含有ペプチドの合成及びトロンビンの酵素活性を押さえるためのその使用は米国特許第4,318,904号、1982年3月9日、ショーラ、に記述されており、その開示は参考文献としてここに組み込まれている。

式(1)のペプチドにより表わされるペプチドについての該新規使用法は、該ペプチドが動脈内損傷への血小板沈着を有意に阻害し、それにより血小板依存性動脈血栓症の危険性を減少させるという発見から生まれた。

このように、本発明は患者における血小板依存性動脈血栓症を予防する方法で、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチド、好みのPPACKを投与することを含む方法に関する。

式(1)のペプチドに関して使用される“治療上有効な量”という句は、該被験者のトロンビン時間を最低約2倍、好みの最低約5倍、より好みの最低約10倍延長させるに十分なペプチド量を表す。本発明の好みの治療においては、式(1)のペプチドは血漿中のペプチド濃度が最低約0.2マイクログラム/ミリリットル( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、好みの最低約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好みの最低約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達するに十分な量を投与される。治療上有効な量の式(1)のペプチドの通常投与は血漿中のペプチド濃度が、約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好みの約

#### A. 定義

“血管形成術”は狭窄された(狭窄した)動脈血管の外科的再構造を表す。“経皮的血管外血管形成術”は医療カテーテルによる動脈血管の拡張であり、該医療カテーテルは皮膚を通して選択された血管中に挿入され、その後血管の管腔を通して狭窄部部位に達し、そこで該医療カテーテルを動脈壁に対する平らなプラグになるまで膨らまし、それにより患部動脈内に流路を再設置する。

“抗凝血剤”は凝血を妨害し、それによりフィブリリン形成を阻害する薬剤を表す。

“動脈内損傷”は循環中に動脈血が触れる血栓形成表面を表す。通常の動脈内損傷は動脈壁の内皮剥離領域、非内皮処理補綴装置などである。

“動脈内補綴装置”は、動脈血を受けて輸送するように原管構造内に挿入される生物由来若しくは合成血管補綴を表す。

“凝血”は血液の多段の凝血因子が相互作用し、その結果フィブリリンを形成する連続過程を表す。

“動脈内膜切除術”は動脈の厚化被アテローム内膜の切取を表す。“ガス動脈内膜切除術”は、アテローム性動脈硬化症の治療において心臓血管からプラグ状沈着物を除去するために高圧二酸化炭素を利用して行なう動脈内膜切除術を表す。“レーザー動脈内膜切除術”はアテローム性動脈硬化血管を除去するために、カーネル指向性レーザーを利用して行なう動脈内膜切除術を表す。

図々の文法上の形態における“式(1)のペプチド”は第1図に示す式(1)により表わされるペプチド及びそのハロゲン酸付加生成物を表す。

#### B. 治療方法

本発明は第1図で示される式(1)(式中、Zは水素若しくは

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好みの約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲である。すなわち、上記の血漿濃度の式(1)のペプチドを含有する循環血液が血小板依存性動脈血栓症を予防する方法を提供する。

該血漿中の式(1)のペプチドの濃度測定法は本技術分野において周知であり、好みの方法が、コレラ、ジャーナル・オブ・ラボラトリ・アンド・クリニカル・メディシン、99卷、第76~83頁、1982年、に記述されており、その開示は参考文献としてここに組み込まれている。

患者(ヒト被験者)における血小板依存性動脈血栓症の存在を診断する方法は、本技術分野において周知である。それらの方法には、コントラスト血管造影法、動脈造影法、コンピューターX線体軸断層撮影(CAT)スキャン、放射性核種ラベル化小板を用いたインビオ映像法、二次元ドッパー装置を用いたロケーション(location)法等が含まれる。血小板依存性動脈血栓症が投射を演じる特殊な疾患も本技術分野では周知であり、脳卒中若しくは一過性大脳虚血により明らかになる脳血管アテロース性動脈硬化症;心臓虚血、非安定性アングina若しくは急性心筋梗塞により明らかになる心臓アテロース性動脈硬化症;及び末梢虚血により明らかになる末梢動脈閉塞症等が含まれる。

血小板依存性動脈血栓症の治療を必要とする患者には、狭窄動脈内の血流を改善するために医療(治療)装置を受ける者も含まれる。たとえば、動脈潰瘍、アテローム性動脈硬化症プラグ状動脈血栓等の閉塞性存在を除去するために行なわれた治療処置の間に被膜化されなかつたか若しくは作られた動脈内損傷によって誘導された血小板依存性血栓症による治療後再狭窄症を多くの患者が経験する。

特表平4-501848 (6)

このように、本発明は患者における治療後動脈再狭窄症を予防する方法で、以下の(i)、(ii)及び(iii)を含む方法に関する：

(i) 該患者に対する治療上有効な量の式(1)のペプチド、好ましくはP P A C Kの投与。

(ii) 該患者に対する狭窄動脈内の血栓管直径を増大させ、それにより狭窄動脈を作成するための医療処置の実施。狭窄動脈の血流管直径を増大させるための医療処置は本技術分野において周知であり、外科的処置（手技若しくは、器具あるいは装置の介在によってなされる、手による若しくは操作運転による治療方法）及び薬物療法を含む。たとえば、狭窄動脈の血流能力を改善するために行なわれる外科的処置には、動脈内膜切除術、特に、ガス若しくはレーザー動脈内膜切取術、血管形成術、動脈血管補綴挿入等が含まれる。

狭窄動脈の血流能力を増大させるための医療処置には、患者への治療上有効な量の血栓崩壊剤の投与も含まれる。血栓崩壊剤及びそれらの使用は同様に本技術分野において周知である。市販の血栓崩壊剤にはストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ及び粗粒プラスミノーゲン活性化剤（t P A）が含まれる。

(iii) 該患者の動脈血を該処置動脈中に循環させる。

治療後再狭窄症の処置に対する好ましい方法において、(i)による式(1)のペプチドの投与は(ii)により該処置動脈を狭窄動脈血にさらすより前に行なわれる。好ましくは、(ii)は(i)にひき続いて行なわれるが、(ii)により投与した式(1)のペプチドの血漿中濃度が最低約 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは最低約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは最低約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に行なわれる。他の臓器においては、(ii)は(i)が行なわれた後約90分以内、好ましくは約15分以内、より好ましくは約5分以内に行なわれる。

装置等が含まれる。エクスピボの治療装置の使用は本技術分野においては周知である。

補綴表面上への血小板沈着を予防する好ましい方法において、(i)による式(1)のペプチドの投与は、(ii)により該患者の動脈血を補綴表面上に循環させるより前に行なわれる。好ましくは、(ii)は(i)にひき続いて行なわれるが、(ii)により投与したペプチドの血漿中濃度が最低約 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは最低約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは最低約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に行なわれる。他の臓器においては、(ii)は(i)が行なわれた後約90分以内、好ましくは約15分以内、より好ましくは約5分以内に行なわれる。しかしながら、本発明は(i)及び(ii)が実質上同時に行なわれ、かつ(ii)が(i)より先に行なわれる方法にも関する。

式(1)のペプチド若しくはそのハロゲン酸付加生成物は通常溶液若しくは懸濁液の形態の医薬用組成物として投与されるが、もっとも、周知のようにペプチド類は説剤、丸剤、カプセル剤、休眠剤若しくは粉末剤としても治療投与用に処方することができる。いずれの場合も、該投与組成物は約0.1%から約99%、好ましくは10%～90%、より好ましくは25%～75%の式(1)のペプチドを含有する。

活性成分としてペプチド類を含有する治療用組成物類の製造は本技術において周知である。通常、このような組成物類は液体溶液若しくは液体懸濁液のいずれかの注射可能組成物として製造されるが、もっとも注射前に液体、若しくは懸濁液にするのに適当な固体形態類も製造することができる。該製造物も乳化することができる。該活性治療用成分は、医薬上許容しうるかつ該活性成分（ペプチド）と適合する無機及び／又は有機賦形剤としばしば複合される。適当な賦形剤としては、たとえば、水、生理食塩水、

しかしながら、本発明は(i)及び(ii)が実質上同時に（同一時間に）行なわれ、かつ(ii)が(i)より先に行なわれる方法にも関する。

動脈血栓症に対する治療を必要とする患者にはさらに、その狭窄動脈血栓が血栓形成表面を通過することになる患者が含まれる。血栓形成表面が動脈病理にさらされる状態は動脈補綴装置を外科的に挿入してある患者において通常発生する。このように、本発明は動脈補綴表面の血小板沈着を予防する方法で、以下の(iv)及び(v)を含む方法に関する：

(iv) 該患者に対する治療上有効な量の式(1)のペプチド、好ましくはP P A C Kの投与。

(v) 該患者の動脈血を補綴表面上に循環させること。

患者の循環中に外科的に挿入されその表面が動脈血にさらされる動脈内補綴装置は本技術分野において周知である。<sup>1</sup>生物由来及び合成血管補綴、<sup>2</sup>J. スタンレイ編、グルーン及びストラットン、ニューヨーク、1982年、を参照のこと。生物的動脈補綴の例としては、自家動脈移植片、特に自家伏在静脈動脈移植片、ジアルデヒドでんぶん一褐色化（tanned）ウシ異種移植片、ヒト臍帯静脈移植片等が含まれる。合成動脈補綴も本技術分野では周知であり、ダクトン移植片、米国特許第3,982,153号に記述されたもののような並張ポリ四フッ化エチレン移植片、米国特許第4,697,482号に記述されたもののような環水性重合体連結移植片等が含まれる。

動脈補綴表面の例としては動脈ステン（stent）、A-V吻合等がある。A-V吻合は通常非内皮処理化管断片で、一般に重合物質で構成されており、動脈血を直接静脈に輸送するか若しくは、最初に静脈を通してエクスピボ（生体外）の治療装置に輸送するために使用される。エクスピボの治療装置の例としては心肺補助

デキストロース、グリセロール、エタノール等、及びそれらの混合物がある。さらに、必要ならば、該組成物は該活性成分の有効性を高める少量の溶剤あるいは乳化剤、pH調整剤等の補助剤を含有することができる。

本発明の実施において有用な治療用組成物は、中性の医薬上許容しうる塩の形態で該治療用組成物中に処方された式(1)のペプチドを含有することができる。医薬上許容しうる塩類には該酸付加塩類（該ポリペプチド若しくは抗体分子の遊離アミノ基と形成される）及び、たとえば塩酸あるいはリン酸等の無機酸、若しくは酢酸、尿酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸と形成されるものが含まれる。該遊離カルボキシル基と形成される塩類はまた、たとえば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、若しくは水酸化鉄（II）等の無機塩基類、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基類より誘導することができる。

該治療用ペプチド含有性組成物は通常静脈内に、たとえば単位投与量を注射することにより、投与される。本発明で用いられる治療用組成物に関して使用される“単位投与量”という用語は、ヒトに対する単位投与として適当な物理的に不連続の単位を含い、各単位は必要な賦形剤とともに求められる治療効果をもたらすよう計算されたあらかじめ決められた量の活性物質を含有する。

該組成物は該投与処方に適合した形式で、かつ治療上有効な量を投与される。投与されるべき量は治療をうける患者、すなわち該患者の止血系の該活性成分を利用する能力、及び求められる血小板凝集因数の程度に依存する。活性成分の投与を必要とされる正確な量は該医師の判断に依存し、各個人に特有である。もっと

## 特表平4-501848 (7)

も、適当な投与量範囲はしないし数百ナノモル／キログラム体重／分のオーダーの式(I)のペプチドであり、投与経路に依存する。

他の這樣においては、本発明は両端の開いた実質的に非弾力性の中空本体部分を持つ延長管断片を含む血栓抵抗性血管補綴に関する。該中空本体部分は制限された流管であることの定義となる管腔（循環血栓形成性）表面を持つ。式(I)のペプチドは該管腔表面に除去可能に付着している。

「除去可能な付着」は、式(I)のペプチドが制限された該血管管を通って循環する血液と接触する間に該血管中に溶解できるように該補綴の管腔表面に付着していることを意味する。除去可能な付着は、固体若しくは液体の形態の式(I)のペプチドの該管腔表面上の吸着による沈着を含む周知の方法により完成される。実質的に純粋な形態（最低約99%の純度）のペプチドを該表面に結合させた場合、それは該凝固血栓と接触する間に非常に迅速に溶解して、該管腔表面上に該ペプチドの血管中溶解度にはほぼ等しい局所ペプチド濃度を提供するであろう。

好みらしい這樣においては、該補綴装置の該管腔表面に除去可能に付着した式(I)のペプチドは徐放性処方の一節として存在する。通常の徐放性処方は医薬上許容しうる生物分解可能な賦形剤と混合された式(I)のペプチドを含む。徐放性処方中の使用に適した医薬上許容しうる生物分解可能な賦形剤類は周知であり、重合体類（たとえば、ポリエチレンジコール）、ポリアミノ酸類（たとえば、ポリグリコール酸）等を含む。式(I)のペプチドを含む徐放性処方が該管腔表面に除去可能に付着された場合、該血液中のペプチドの局所濃度（すなわち、該血管-管腔表面界面における該ペプチド濃度）は該賦形剤の溶解速度に比例すると思われる。ペプチド対賦形剤の割合は、本技術分野において周知なように、試

形剤の選択及び該補綴血管内の血流条件に依存するため、治療上有効な量の式(I)のペプチドは徐放性処方が用いられる場合、数時間から数日の間、該管腔表面に接觸する血液に供給される。

本発明の血管補綴は、その好みらしい這樣においては、実質的に非弾力性である。ここで使用する場合、「非弾力性」という表現は、正常な動脈圧（250 mmHg以下）下の収縮期及び拡張期の間に内径の伸張が10パーセント以下を示すことを意味する。該血管補綴の外部表面は、現在市販されている補綴について一般的である様に、ヒト若しくは他の哺乳動物における移植時に組織固定してもよい。

該血管補綴の該管状分部は必要な強度、耐久性及び総合性を示す物質で構成されてもよい。我々が該補綴若しくは移植片を作成するのに適当な市販の物質には、ダクロン（C. R. パード社、ビレリカ、マサチューセッツ州）等のポリエステル及びテフロン（ゴアテックス）（W. L. ゴア、フラグスタッフ、アリゾナ州）等のポリフッ化炭素が含まれる。

好みらしい這樣においては、該管腔表面は比較的なめらかで、非極性の疎水性表面を形成する重合体類を含む。このような物質類及び管腔表面の一部を形成する膜のおおののの使用はハンソンの米国特許第4,687,482号に記述されており、その開示は参考文献としてここに組み込まれている。

本発明の血栓抵抗性血管補綴は、式(I)のペプチドを該補綴の該管腔表面上に除去可能に付着させることを含む方法により製造される。このように、血管補綴装置の管腔表面への式(I)のペプチドの除去可能な付着は、該装置の血栓抵抗性を改善する方法である。  
実施例

以下の実施例は本発明を具体的に表わすことを意図しているが、

制限することを意図しない。

### 1. 合成動脈移植装置上の血小板沈着のインピボ阻害

制御されない変数のない形式でのインピボの急性動脈血栓形成の速度を定性するために、血管移植片血栓症の一次モデルを使用した。ヒトはヒトと同様の血栓症経過を持つらしいので、これらの実験に対してヒトを選択した。急性血栓形成の程度は、ハンソンら、アルテリオ、5巻、第595-603頁、1985年、に記述されているように、自己由来の「インジウムラベル化血小板の内小径ダクロン血管移植片の断片上への吸着をシンチレーションカメラで映像化することにより、実時間に測定した。

要約すれば、長期動脈シャントは正常な10-12キログラムのオスとヒト（バビオニアビス）の大鼠動脈間に外科的に移植された（A-Vシャント）。該永久的シャント系は13-及び15-ゲージのテフロン管先端（ライフメド、ベニトロソ社、コンブトン、カリフォルニア州）に接続した内径（1.d.）3ミリメートル（mm）、長さ25センチメートル（cm）のシラスティック管（ダウコーン社、ミドランド、ミシガン州）2本から成る。さらに、2本の該シラスティック管を皮膚出口部位でダクロン結合カフス（デュポン、E.I. DuPont社、ウィルミントン、デラウェア州）で固定した。2個の該シラスティック吻合断片を長さ1cmの鈍角末端のテフロン管（内径2.8mm）で連結することにより、血流を確立した。全実験において、その後ダクロン血管移植片を該永久シラスティックA-V吻合断片間に挿入することにより、該動物の外科的に連結した。

モデルの合成血管補綴は以下の方法で、長さ10cmの非クリンピングニットダクロン移植片材料（サビッジエクスター・ナルペロア、120mmHgにおける平均有孔性：2000ないし2200

ml/H<sub>2</sub>O／分、内径4.0mm）を血液漏出不透性にすることにより、該A-V吻合系での使用にむけて製造された。

最初に、4.0mm径のテフロンロッド（あらかじめ、穂やかな石けん液、それに次いでエタノールを使用し、最後に滅菌蒸留水ですすぐことにより完全に洗浄してあるもの）を該移植片中に挿入した。その後、該移植片を外側から5×10cmのバラフィルムシートで包み、長さ10cm、内径6.3mmの「熱収縮性」テフロン管（スマーリーパーツ社、マイアミ、フロリダ州）に入れた。

該移植片を含むテフロン管を低ブンセン炎上で約5.3mmまで収縮が起きるまで穂やかに加熱し、その結果初めの該移植片表面を変化させずに該外部織地間隙上に該バラフィルムを圧縮させた。シリコンゴム管、長さ1cm×内径4.0mm、を該テフロンロッド上に移動し、シラスティック医療用接着剤、シリコンタイプAを用いて該移植片断片の両端に接着した。該重合体を24時間硬化させた後、該テフロンロッドを該管腔内から往復深くひき出した。本処置により、直線形状に厳密に圧迫され4.0mmの内径を持つ不透性移植片が製造された。でき上がった該血管管は、連結処置による欠陥もなしに該シラスティックから移植片表面への縫合がなめらかであった。該移植片は純端テフロン接着子を用いて該ヒトの吻合系内に接続された。

自己由来のヒト血小板を以下の処置により「111a-オキシン」でラベルした。全血（100ml）を20mlの酸-クエン酸-デキストロース抗凝血剤（NIH処方A）を含むプラスチックバック中に直接採取した。該血液を該バック内で300rpmで10分間遠心した。上清の濃-血小板血漿（PRP）を第2のバッグにその後移し、0.15Mのクエン酸（0.1ml/10ml PRP）を加えてpH6.5に調整した。赤血球分画は供血動物に返却した。該

PRPを1300×gで15分間遠心して血小板をペレット状にした。上清の血小板不足血漿（PPP）は完全に別の容器に移し、貯蔵した。

残りの血浆蛋白類を除去するために、該血小板ペレットを含むバッグを30mlのリンガーのクエン酸デキストロース（RCD、pH6.5）を上層した後他の移し廻繋することにより、往復深く一回洗浄した。該ペレットをその後ゆっくりと5.0ml RCDに再懸濁し、500-700マ.イクロCi <sup>111</sup>In-オキシン（アマチャム社、アーリントン、ハイツ、イリノイ州）とともに30分間インキュベートした。混入している赤血球は最後に2000×gで5分間低速遠心して除去了した。

200マイクロリッターのラベル化血小板懸濁液を5.0mlのRCDで希釈し、0.5mlの該弟駄血小板懸濁液の放射能を、3000×g、30分間の遠心後得られる無細胞上清0.5mlの活性と比較することによりラベル効率を測定した。約13パーセントの非血小板結合性アイソトープを含むラベル化血小板懸濁液の測定した量を、100マイクロリッター標準液を調整した後に直接受血哺乳動物に注射した。非血小板結合性アイソトープを除去するためさらに洗浄する処置は、インピトロの細胞損傷をもたらすと思われたため望まないと考えた。

循環血小板 <sup>111</sup>In-放射能は移植片配置前及び後に採取し、2ml/0.5mlの（エチレンジジトリロ）-四酢酸（EDTA）中に加えた4mlの血液サンプルから測定した。各サンプルのうち1mlの血小板数測定に使用し、1.0mlは全血 <sup>111</sup>In-放射能を測定した。残りの2mlを3000×g、30分間遠心し、上清（PPP）のうち1mlについて血漿 <sup>111</sup>In-放射能を測定した。血液及び血漿の全サンプルはガンマスペクトロメーター（ヌクレ

アシカゴ、シカゴ、イリノイ州）を用いて測定した。血小板数測定は電子血小板カウンター（クレイアダムスUF-100、バーシバニイ、ニュージャージー州）を用いて全血について行なった。

<sup>111</sup>Inの両ガンマ光子ピーク（172keV及び247keV）のシンチレーションカメラ映像化には、一般に高エネルギーコリメーションが、感度及び空間的分解能の両方を低下させるにもかかわらず、映像の不鮮明化を防ぐために必要とされてきた。血小板放射能活性が本実験では制限因子ではなかったため、高感度<sup>111</sup>Inコリメーターを <sup>111</sup>Inの低い方のエネルギーピークのみを映像化することにより（172keVピーク及び5%エネルギーウインドウにおいて）良好な分解能を使用することができた。近位及び遠位シラスティック断片を含む該ダクロン移植片の映像はピッカーディ4/11ダイナシンチレーションカメラ（ピッカーレンダード、コネティカット州）を取り、該カメラに連結した医療用データシステムSIMULコンピューター（メドトロニック、アンバーバー、ミシガン州）により保存及び分析した。本システムは64×64ピクセルでデータの同時取得及び分析ができる、図3に示したデータを作るために使用した。該移植片をエクスピードで映像化する直前に、2分間の映像を、血小板懸濁液の200マイクロリッターサンプル（注射液標準）及び自己由来血液で満たされた該移植片と同管腔容量を持つ内径4mmのシラスティック管（血液標準）について取った。

全ての標準液及び管は直線形状を維持するように、該コリメーターの表面から約1cmの所にあるブレクシングラス中に正確に規格化された溝の中に置いた。該標準液及び10cmの移植片の放射能を重要な同じく3.1cm×1.2.5cm領域（1.0cm×4.0西素）についてカウントし、画像分析ソフトウェアルーチンにより定義した。

移植片設置時間から、映像をデータを保存しながら2分間隔で連続的に取った。沈着した <sup>111</sup>In-血小板の放射能は該血漿標準放射能を全動的実際映像から減じることにより計算した。

<sup>111</sup>In-血小板の調製品を1回性射の後数日間移植片を逐次設置し、映像化した。循環する <sup>111</sup>In-血小板放射能は、正常な生理的機能を通じて連続的に、また一連の移植片設置により急性に失なわれたため、血小板蓄積の測定値は、沈着した移植片放射能を各評価の開始時に測定した該移植片内の全血（循環）血小板放射能で割った比率を定義した、移植片/血液比として表現した。本測定値は受血哺乳動物のサイズ、注射したアイソトープの量、若しくは該アイソトープが被覆したと考えられる範囲に依存しないため選択された（リッチャーら、アメリカンジャーナルオブカルディオロジィ、47巻、第882頁、1981年；カロウラ、アニユアルサーチェリィ、191巻、第362頁、1980年）。該移植片/血液比は、しかしながら、該循環中の加熱若しくはトロンボゲン表面上の反復過過の結果として起こる血小板機能の変性における観察のタイミング若しくは順序に依存する。

該移植片/血液比を測定するために、該移植片管腔（1.26ml）内血液の放射能を2個の別々の方法で測定した。最初に、該血液標準（1.57ml血液量）を映像化した後、それを直接計算した。第2の方法では、各実験開始時に存在した血液1mlあたりの放射能を、該注射液標準を各実験前に映像化し、この値には実験時点に採取した全血1mlあたりのCPM（ある経過時点）、において、ガンマカウンターを用いて測定）を掛け、注射液標準の放射能（同様に、1mlにおいてガンマカウンターで測定）で割ることにより計算した。全ての血液サンプル及び標準を各評価シリーズの終わりに同時にカウントした。全ての計算において、

放射能値は血小板放射能のみに関するものであり、全ての血液及び標準についての値は非血小板性アイソトープ分画について補正した。

該血小板沈着（ラベル化プラス非ラベル化細胞）は移植片/血液比に因る：移植片血液容積（1.26ml）×全血1mlあたりの血小板濃度、を掛けて評価した。本計算には、該ラベル化及び非ラベル化血小板母集団が移植片沈着に関しては全時点において同等であったという仮定が含まれた。上記の方法により測定した該血管移植片上への直線小板沈着に対する値は第3図に示す。

無処置の対照動物において、該血管移植片上への血小板沈着は、60分で8.5×10<sup>9</sup>血小板のプラトー値に達し（第3図）、該移植片は1.2±0.2時間で閉塞した。さらに、表1に示すように、これらの对照実験における血栓形成期間中に、血小板特異性アルファ颗粒蛋白である血小板因子4（PF4）及びベータトロンボグロブリン（BTG）、及びトロンビンによるフィブリノーゲン開裂産物であるフィブリノペプチドA（FPA）の血漿レベルの上昇が観察された。

## 特表平4-501848(9)

表 1  
血管移植片血栓形成に対する PPACK の効果

	基準値	PPACK 处置
	移植前 移植後	移植前 移植後
血小板数 ( $\times 10^9/L$ ) <sup>†</sup>	344 ± 88 290 ± 75	275 ± 56 269 ± 54
<sup>111</sup> In-血小板沈着 ( $\times 10^3$ ) <sup>‡</sup>	... 8.5 ± 1.0 ...	0.6 ± 0.2
血漿 PPF <sub>4</sub> ( $\mu g/L$ ) <sup>§</sup>	9.2 ± 2.4 18.5 ± 1.7 7.1 ± 1.9	4.4 ± 0.2
血漿 B-TG ( $\mu g/L$ ) <sup>§</sup>	6.0 ± 2.6 26.2 ± 1.2 8.0 ± 2.0	1.4 ± 0.2
血漿 FPA (nmol/L) <sup>§</sup>	20.8 ± 2.7 27.2 ± 8.6 19.0 ± 4.7	2.0 ± 0.54

† 全血中で電子的 (J. T. ベイカー、810型分析器、アレントン、ペンシルバニア州) にカウントした血小板数は、血管移植片血栓形成期間中の血小板形成により移植腫瘍において減少した。

‡ 血漿 PPF<sub>4</sub> 及び B-TG はハンセンら、アーテリオスクレロシス、5巻、第595-603頁、1985年、に記述されているように採取及び処理した血液サンプルに対するラジオイムノアッセイにより測定した。血漿中のこれらの血小板特異性蛋白の増加は、血栓形成に利用された血小板からの放出を反映した。

§ 前記のハンセンらの方法によるラジオイムノアッセイにより測定した FPA 値も同様に増加しており、移植片血栓における血

栓形成腫瘍中のトロンビンによるフィブリノーゲン凝固産物を表わしている。

ヘパリンの通常用量（該移植片を動脈直にさらす前に既として 100 単位/kg 投与）は移植片血小板沈着に効果を持たなかった（第3図B： $p > 0.5$ ）が、ヘパリン用量を 10 倍増加すると部分的に有効であった（第3図C）。アスピリン（移植片設置の 2 時間前に経口で 3.25 mg/kg/日投与）及びアスピリンとヘパリン（100 単位/kg）の併用のいずれも、同様に行なわれた以前の実験における血管移植片 <sup>111</sup>In-血小板沈着に影響を及ぼさなかった。ハーカーら、「血管疾患：最新の研究と臨床応用」、ストランドネスラ編、オーランド、グルーケンアンドストラットン、第271-283頁、1987年、参照のこと。このように対照動物においては、該血管移植片は血栓形成性が高く、フィブリノーゲン凝固産物（ヘパリン処置）、血小板凝集の阻害（アスピリン処置）若しくはそれらの両方（アスピリン及びヘパリン処置）を目的とした通常の抗血栓症治療に抵抗性を持った。

対照的に、PPACK の血漿中濃度を約 1-2  $\mu g/\text{ml}$  にする 100 nmol/kg/分の速度での静脈内注入は <sup>111</sup>In-血小板沈着を完全に押さえ、移植片閉塞を予防した（第3図A）。表2に示すように、PPACK はまた止血性血小板プラグ形成も押さえ（出血時間を 30 分以上に延長し、対照値に比較して  $P < 10^{-3}$ ）、トロンビン誘導性血液凝固も押さえた（トロンビン時間 > 10 分、対照値に比較して  $P < 10^{-3}$ ）。

表 2  
止血作用に対する PPACK の効果

血小板 <sup>†</sup>	基準値	PPACK 投与期間中	PPACK 投与後
	(100 nmol/kg/分)	(15 分)	
血小板数 ( $\times 10^9/L$ )	290 ± 75	275 ± 56	269 ± 54
出血時間 (分)	5.4 ± 0.3	> 30	5.9 ± 2.6
凝集 (E D <sub>50</sub> ) :			
ADP ( $\mu M$ )	7.1 ± 0.8	2.3 ± 0.3	--
コラーゲン ( $\mu g/\text{ml}$ )	4.2 ± 0.4	2.6 ± 0.3	--
トロンビン (U/ $\text{ml}$ )	0.1	> 20	
凝血			
フィブリノーゲン ( $\text{mg}/\text{L}$ )	3.67 ± 0.33	3.80 ± 0.33	3.75 ± 0.35
トロンビン時間 (秒)	21 ± 3	> 600	19 ± 1
フィブリノーゲン溶解			
コラーゲン ( $\text{mg}/\text{L}$ )	163 ± 13	163 ± 8	174 ± 7
D-フィブリノーゲン ( $\text{mg}/\text{L}$ )	0.45 ± 0.10	0.49 ± 0.08	0.53 ± 0.13

† 血小板止血作用を、血小板数、血小板プラグ形成能（テンプレート出血時間）、及び血小板凝集に関して評価した。血小板凝集はクエン酸添加の攪拌血小板液の攪拌壁漏液を測る先送過濾を記録することにより測定した。該結果は 1/2 最大凝集をもたらすのに必要な作用物質（ADP、コラーゲン及びトロンビン）の濃度で表わしてある。結果は平均値 ± 1 標準偏差で表わしてある。

加えて、PPACK 投与期間中に血小板若しくは FPA から血漿中の PPF<sub>4</sub> 若しくは B-TG の放出は検出されなかった（表1）。

表3に示したインピボの用量-作用実験の結果は、トロンビン誘導性血液凝固及び出血時間の遅延化と、約 15 分間の 1.0,

nmol/kg/分の速度での注入でもたらされた約 1-2  $\mu g/\text{ml}$  の PPACK 血漿濃度において観察された最大効果における予想外の一致を明らかにしている。

表 3  
PPACK の用量-作用効果

PPACK 用量 <sup>†</sup> (nmol/kg/分)	出血時間 (分)	トロンビン時間 (秒)
0	5.4 ± 0.3	1.7 ± 3
1.5	7.6 ± 1.6	1.9 ± 3
3.0	9.5 ± 4.2	2.2 ± 2
6.0	26.6 ± 3.4	2.79 ± 1.32
10.0	> 30	> 600

† 5 匹の別々の動物において、表示した用量増量形成に従って PPACK を静脈内注入した。15 分間の所定量の連続注入の後、移動プレート出血時間測定を開始し、トロンビン時間測定に血液を採取した。次の用量への増量は出血時間測定が完了した後即ちに行なった。該結果は平均値 ± 1 標準偏差で表わしてある。

PPACK をヒビ血漿にインピボで加えた場合、トロンビン時間は 6  $\mu M/L$  以上の濃度においてはっきりと長くなつたが、これは該住人データ（表3）と一致する。治療期間中、心拍数及び血圧に対して何ら効果ももたらさなかつた。PPACK 住人停止後、<sup>111</sup>In-血小板の移植片沈着は第3図Aに示すように 30 分間で常態化し、出血時間及びトロンビン時間は表2に示すように 15 分以内に十分正常化した。

トロンビン誘導性血液凝固は PPACK が 3.2 ± 0.1 nm (– g/L) 以上の濃度で存在した間押さえられた（表2）が、一方

コラーゲン若しくはADPにより誘導される血小板蓄積はPPACKによって阻害されなかった(表2)。このように、血小板の固有的の反応性は影響を受けなかった。

#### 2. 血小板沈着及び動脈再狭窄のインビザにおける阻害

A. PPACKの動脈再狭窄阻害能をインビザの動脈移植片持入及び動脈内膜切除のヒビモデルにおいて試験した。移植片持入として、長さ3cmのゴアテックス移植片(内径4mm)の形態の小血管補綴を、オスのヒビの頸動脈中に外科的に挿入した。該移植片を通して(該補綴表面上を通りて)動脈血液を循環させる直前、及びその後1時間の期間中、約100nmol/kg/分の速度で該ヒビにPPACKを静脈内投与した。対照動物はPPACK処置を受けなかった。<sup>111</sup>In-血小板沈着は実施例1に記述したように動脈血流を再構成したものについてモニターした。

動脈内膜切除術として、ヒビの頸動脈に標準的外科処置により動脈内膜切除を行なった。該内膜切除(処置)動脈を通しての血液流量の直前、及びその後約1時間の期間中該ヒビに約100nmol/kg/分の速度でPPACKを静脈内投与した。対照動物はPPACK投与を受けなかった。

両実験の結果は同等であった。該動脈内膜切除実験のデータは第4図に示されており、血小板沈着(再狭窄)がPPACK投与を受けた動物においては対照動物と比較すると90-95%阻害されたことを示している。

B. 頸動脈内膜切除別の実験においては、体重が8ないし11kgの14匹のヒビ(オス10匹及びメス4匹)に、ここに記述した標準的外科処置により動脈内膜切除を行なった。

動物達に前麻酔としてアトロビン(0.04mg/kg筋注)を投与し、その後導入用にケラミン(10mg/kg筋注)及び維持用に

気管内チューブによるハロタノ(酸素中1%)を用いて麻酔した。頸部中線切開を通じて、該頸動脈を近位は頸骨から遠位は頸動脈分歧点までの周辺組織から離すように切開した。該頸動脈を、強酸ヘパリン(100単位/kg)、(U)/(kg)、静注)の滴注往來の3分後に該露出血管の各末端に設置した非外傷性血管クランプを用いて横に縛め、該遠位横断クランプの1cm近位を分割した(第6図)。該近位動脈断片をその後曲ビンセット上に裏返した。該ビンセットを該血管の切断末端から挿入し、その後管腔内側から該動脈壁の全厚みの引っ掛かりを得て、近位方向の該血管分割末端を逆に引っ張って裏返した。最大露出が得られた後、該管腔露出断片上に一对のポリプロピレン固定縫合(7-0)を近位の両側に、また第2の対を遠位に取り付けた。その後動脈内膜切除術を、裏返した該血管断片の分割末端から1cmの所から始めて施し、1cmの区間連続して行なった。本処置にはビンセット及び手術用顯微鏡(倍率×32、マイス手術用顯微鏡、西ドイツ)を用いて該正常内膜、及び中膜の厚みの一部を機械的に除去することが含まれた。動脈内膜切除術の後、該血管をその正常な配置に戻し、2分の倍率下で7-0ポリプロピレン糸で末端一束吻合術を施した。該処置動物において、静脈内PPACK注入は該手術頸動脈中の血流回復の5分前に開始した。5-MH<sub>2</sub>ペンシル型ドッパー探針(バーカス電子研究所、ビーパートン、オレゴン州)を用いて該動脈内膜切除部位の近位と遠位、及び該吻合部位について閉存を評価した。<sup>111</sup>In-源を内部標準として移植した(以下参照)。傷を断続的縫合で閉じ、シンチレーションカメラによる映像化を即ちに行なった。該動物達は該処置に十分耐えた。血液損失量の評価は約25mlであった。

自己由来のヒビ血小板を、先に実施例1で述べたように800

-1000μCi(1Ci=37GBq)の<sup>111</sup>In-オキシドでラベルし、該手術処置の前に注射した。

中型エネルギー計測器を<sup>111</sup>インジウムの低及び高エネルギーピークの双方を映像化することにより良好な分解能を使用した。該頸動脈の映像をピッカーディイナシンチレーションカメラ(ピッカーレー社、ノースフォード、コネティカット州)で取り、該カメラに接続した医療用データシステムAコンピューター(メドトロニック、アンアーバー、ミシガン州)により分類及び分析した。全血5mlサンプルについても同様に映像を取った(血液標準)。

校正のために、小<sup>111</sup>In-ラジオアイソトープ源(約5μCi)を0.6cm内径のポリエチレン管(PB-50、クレイアダムス社、ニューヨーク、ニューヨーク州)の末端に密封し、手術時に該動脈内膜切除部位と同じ組織面内の該頸動脈に接続して設置した。初期5分の映像を取った後(以下参照)、該<sup>111</sup>In-源を回収し再カウントした。傷の中に移植された時点と除去後の該内部標準の<sup>111</sup>In放射能の比率は、該動脈内膜切除部位に沈着した<sup>111</sup>In放射能に対する介在組織の減衰作用を直接測定するものとなる(ハンソンら、アルテリオスクレロシス、6巻、第511-518頁、1986年)。5ml全血標準、傷からの除去前後の内部標準、動脈内膜切除部位及び対照側動脈の放射能を、画像分析ソフトウェアルーチンにより定義しながら、重要な領域についてカウントした。沈着した<sup>111</sup>In-血小板の放射能は、該対照側動脈領域の放射能を実験映像から減じ、組織液波について補正し、該全血標準を用いて該結果を沈着した血小板で表わすことにより計算される。

実施例1の場合と同様に、循環する<sup>111</sup>In-血小板放射能は正

常な生理的構造を通じて連続的に失なわれ、また該急性映像の後の血小板蓄積の測定値は該数の形では変わることができない。データはより遅い時点で取り、動脈内膜切除領域放射能から対側性非処置対照動脈管腔内の該血管血小板放射能を減じ、該血液標準放射能で割った比率を定義した該動脈内膜切除/血液比として表現する。本測定値は該動物のサイズ、注射したアイソトープの量若しくは該アイソトープが減衰したと考えられる範囲に依存しない。全ての計算において、放射能は血小板放射能のみに関するもので、全血及び標準値は非血小板性<sup>111</sup>In-放射能小分率について補正した(ハンソンら、ジャーナルオブクリニカルインベスティゲーション、81巻、第149-158頁、1985年)。

各動物に同側頸動脈内膜切除術に統一し、血流を回復させた60及び90分後、及び24、48、72時間後に5分間シンチレーションカメラ映像を取った。術後第1日目に24時間時の映像を取り前に、各ヒビを塩酸ケタミン(10mg/kg)で麻酔し、該傷を開き、該ペンシル探針ドッパーを用いて動脈閉存性を評価した。該傷を閉じ、映像化を行なった。

血小板カウント及びヘマトクリット測定をベーカー810型全血分析器を用いて、Kawabata(2mg/ml)中に採取した全血について手術前及び2日間毎日行なった。平均血小板カウントは対照群が $318 \pm 70 \times 10^3/\mu\text{L}$ で、処置群は $296 \pm 53 \times 10^3/\mu\text{L}$ であった。

出血時間測定は、先にヒビでの実験について述べられた標準テンプレート法(ハーカーら、プラッド、58巻、第824-834頁、1980年)を用いて、前腕の毛をそった手の平の裏面において二回ずつ行なった。

PPACKの抗トロンビン活性レベルを点滴前、点滴開始後

## 特表平4-501848 (11)

30分及び60分、及び治療終了後30分に、酸-クエン酸デキストロース(ACD)に採取した血液から調製した血漿について測定した。血漿抗トロンビン活性レベルは、該動物自身の対照処置前血漿中に調整したPPACKについての標準曲線を用いて、即ちにアッセイするか、若しくは後でアッセイするように-70度で瞬間凍結した。

該PPACK溶液は0.1M NaClに溶解し、滅菌封緘した。該PPACK溶液をシリジングポンプ(ハーパート機器社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)を用いて100ng/kg/分の速度で約1時間連続的に注入した。

血小板は、対照動物においては即座に頸動脈内膜切除部位には著し、血流再開後60分以内にプラトーに達した(第7図)。その後動脈内膜切除対比率(EBR)は、該対照動物においては上昇し続け、最初の3日間に $3.0 \pm 0.5$ から $3.25 \pm 0.48$ に極くわずか増加した( $p = 0.759$ ; 第7図)。対照的に、手術後90分の該動脈内膜切除部位への急性血小板沈着はPPACK処置を受けた動物では該対照動物に比較して著しく減少した(それぞれ、 $1.59 \pm 0.36 \times 10^9$ 対 $1.67 \pm 1.61 \times 10^9$ 血小板数/ $\text{cm}^3$ ;  $p < 0.002$ )。また、その後3日間の血小板沈着も該動脈内膜切除領域の正味の放射能対照対照の血液放射能のそれぞれの比率(EBR)で評価すると減少し続けた。手術当日の90分後において、該比率はそれぞれPPACK処置動物については $0.82 \pm 0.25$ 、また対照動物については $3.03 \pm 0.51$ であった。3日後のEBR比率は該対照動物では $3.25 \pm 0.48$ であったのに対して、PPACK動物では $0.85 \pm 0.23$ であった。ドップラースキャニングによると管理中24時間について両群とも該血管は全て開存していた。

PPACK点滴は最低3日間血小板沈着を有意に阻害することを示している。

本技術分野で示唆されるようなPPACKの連続的投与は、それゆえ手術後遅くまで有意の治療的效果をもたらすために必要ではない。

本発明はこのように、哺乳動物における血管形成術、動脈内膜切除術、血管内ステント設置及び小腸血管移植片移植等の血管処置の介在に伴なう血小板依存性動脈血栓症を予防する手段を提供するものである。

### 3. 動脈裸露表面への血小板沈着の阻害

A. 長期動脈大創部吻合内に設置したエクスピボの治療装置の例として中空線維(キャビラリー)血液透析器を用いてのPPACKの作用を、組織表面における抗血栓作用を証明するために選んだ。

0.8mキュプロファンキャビラリー血流透析器(12.11型; トラベノール、ディアフィールド、イリノイ州)を実施例1で述べたように7匹の別々のオスのヒビのA-V吻合系内に挿入した。PPACKを該ヒビに100ng/kg/分の速度で、該ヒビの動脈血が該透析器の捕獲面上を(該透析器のキャビラリーを通して)循環する以前及び循環中にわたり約1時間静脈内投与した。比較する目的で、対照実験としてPPACKの代わりにヘパリンを投与した。ヘパリン投与は150単位(U)/kg体重の初回塊投与、及びそれに続く該ヒビの動脈血が該透析器を通過する以前及び循環中の1時間にわたる150U/kg/時間の継続的点滴から成った。該捕獲(キャビラリー)表面における血小板沈着の阻害は、該透析器を通じて動脈血を循環させた前後の該透析器により保持される生理食塩水の容量を測定することにより判定

該手術後90分に得られたシンチレーションカメラ映像は、対照動物の該動脈内膜切除部位における血小板の集点蓄積を明らかにした。PPACK処置は該動脈内膜切除部位における $11\%$ 、一血小板放射能の著しい減少を結果としてもたらした。動脈内膜切除術の3日後の、非処置動脈内膜切除血管表面のスキャニング電子顕微鏡検査は、急性の血小板血栓形成を明らかにした。PPACK処置を受けた動物の動脈内膜切除部位における目に見える血小板沈着は著しく減少した。

PPACKの血漿レベルは点滴期間中一定に維持され、点滴停止後即ちに低下した(表4)。PPACKはテンプレート出血時間は処置前の $5.6 \pm 0.8$ 分から、点滴期間中は全動物において30分以上に延長した。床出血時間はPPACK点滴停止後30分では正常であった( $6.2 \pm 1.3$ 分)。

血小板数は該対照動物において実験期間を通じて変化しなかった(第3日において、 $296 \pm 53 \times 10^9/\mu\text{L}$ ,  $p = 0.725$ )。

表 4

PPACKの血漿レベル

基準値	—
点滴後30分	$3.72 \pm 0.61 \mu\text{g}/\text{ml}$
点滴後60分	$3.71 \pm 0.47 \mu\text{g}/\text{ml}$
点滴後90分	$1.12 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{ml}$
点滴後24時間	—

本実験の結果は約1時間のPPACKの静脈内投与は、ヒビの頸動脈中に外科的動脈内膜切除術によって作られた重症の損傷部位における血小板沈着を永続的に阻害することを示している。これらの知見はまた、パートAにおける知見と同様に、1時間の

した。

第5図に示すように、PPACKの投与はヘパリンよりも有意に良好に透析器の容量損失を阻害した。

B. 体重が9ないし13kgの幼年オスヒビでの別の実験において、各動物は長髪大鼠用“スクリプナー型”動脈シラスティック吻合を受けた。本永続性吻合システムは検出可能な血小板若しくは凝血の活性化はもたらさない(ハーカーら、ジャーナルオブ クリニカル インベスティゲイション、64巻、第559-69頁、1979年; 及びハンソンら、トロンボシスアンドヘモスタシス、58(3)巻、第801-05頁、1987年)。ヘマトクリット( $3.3 \pm 1.6\%$ )、白血球数( $1.4 \pm 2 \times 10^3/\mu\text{L}$ )及びフィブリノーゲン濃度( $4.03 \pm 2.3 \text{mg/dL}$ )は、使用した動物において全て正常であった。低ヘマトクリット、WBC増加、吻合血流不全若しくは局所的炎症を伴なう動物は該実験から除外した。

各動物は4回実験に使用された。同じ動物について2回の2時間のPPACK灌流(exposure)を2回の2時間のヘパリン抗凝血作用の灌流と比較した。各灌流の間、該吻合からの連続的血流をドップラー超音波流量計(エルアンドエムエレクトロニクス1012型、ディリッシュティ、カリフォルニア州)により測定した。血流速度は180ないし250mm/minの範囲であった。

キュプロファン中空線維型の中空線維透析器(トラベノールCP1211、ディアフィールド、イリノイ州、米国)を使用した。各透析器は同じ動物で同じ抗凝血剤について別々に2回ずつ使用した。該血液透析器の各使用前及びオーバーナイトの存在中、各透析器ユニット(セル)は滅菌液体生理食塩水で満たした。再使用に際しては透析器は4℃で約12ないし約18時間オーバーナ

イトで保存した。血液灌流中、透析器チャンバーは培養等強性生理食塩水で満たされており、排水口には栓をした。医療用シリコングム管、内径3.0 mm、(ダウコーニング社、ミッドランド、ミシガン州)、及び隔壁テフロン管、長さ2 cm、をその後透析器を接吻合に接続するために使用した。

透析器総容積を、総體血栓性閉塞の尺度として各使用の前後に測定した(ゴッチャ、トランザクションズ オブ アメリカソサイエティ フォー アーティフィシャル インターナル オーガンズ、1969年、第87-96頁)。従って、各使用前に、該セルを導導性生理食塩水で満たし、目に見える気泡は全て該総容積から洗い出した。バルブ付圧力計を該動脈圧力調整槽(ヘッダー)に取り付け、4.5トルで1分間空気を流すことにより、該セルの水容積はその後該動脈圧力調整槽から容積測定容器中に量的に回復した。各時間について2回測定を行ない、平均値を取った。

PPACK若しくは標準ヘパリン(該標記由来、インベネクス研究所、チャーリング フォールズ、オハイオ州)を、該透析器にごく近接した該血管接合部の該動脈管中に注入した。該ヘパリン投与は透析器導入の5分前に100 U/kgの初回投与を行ない、その後ハーバードミニクロ点滴ポンプ(901型、ハーバード機器株式会社)を用いて15 U/kg/時で2時間連続的に点滴した。PPACKは該透析器の該標記表面上を血液が循環する以前の約15分間、及びその後標記中の2時間100 ng/kg/分の速度で通常的に点滴したが、安定状態レベルに達するまで約15分間の前点滴を要した。

中空線維容積の損失の測定に加えて、該透析器該標記中の血小板血栓蓄積の程度をシンチレーションカメラ(ピッカー社、ノーマン

フォード、コネクティカット州)により、各使用直後に排水した該透析器中に残存する自己由来<sup>111</sup>Iローラベル化血小板を映像化して測定した。自己由来ヒビ血小板は<sup>111</sup>Iローオキシド(アマシャム社、アーリントン ハイツ、イリノイ州)でラベルし、該透析器を挿入する前に注封した(コッフェラ、トロンボシス アンド ヘモスタシス、53卷、第404-07頁、1985年)。カウント/分(cpm)を与える“初回使用”の該透析器の映像を、該システムから血液を排出し、該総容積の測定を完了した直後に取った。該残存<sup>111</sup>Iヒビ血小板放射能を測定するために第2回使用の前に“再使用”透析器を映像化した。純血小板沈着をその後、該透析器 cpm を該標記血液 cpm/mL で割り、この比率に血液1 mL 中の血小板数を掛けて算出した。

血球数測定(血小板、白血球、及び赤血球)はJ.T.ペイカー全血分析器810型(アレンタウン、ペンシルバニア州)を用いてEDTA2ナトリウム抗凝血全血について行なった(ハンソンら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイションズ、75卷、第1591-99頁、1985年；及びハンソンら、アーテリオスクレロシス、5卷、第595-603頁、1985年)。標準テンプレート出血時間は、ハーカーら、ニューヨーランド ジャーナル オブ メディスン、287卷、第155-59頁、1972年、及びマルバスラ、ブラッド、57卷、第736-40頁、1981年、に記述されている方式で前腕の毛をそった手の平の表面において測定した。出血時間は二回ずつ測定し、平均値を出した。市販のラジオイムノアッセイを血小板第4因子(PP4)(アボット研究所、ノースシカゴ、イリノイ州)、β-トロンボグロブリン(BTG)(アマシャム社、アーリントンハイツ、イリノイ州)、フィブリノペプチドA(FPA)(マ

イクロUSA社、ニューヨーク、ニューヨーク州)及び活性化補体C3抗原(C3a)(アマシャム社)の血漿レベルを測定するために行なった。これらの血漿アッセイ用の血液サンプルは、実施例1の処置及びマルバスラ、上記、及びハンソンら、アーテリオスクレロシス、5卷、第595-603頁、1985年、に記述されているように採取、処置及び測定した。活性化トロンボラストン時間(APTT)は標準法(活性化PTT剤、オルト ダイイグナスティクス、ラリティン、ニュージャージー州)を用いて行なった。綿離計測計(フィブロシステム、ディビジョン オブ ベクトン アンド ディキンソン多元社、コッケイスビル、マサチューセッツ州)を、R.ビッグス、人血の凝固、ヘモスタシス アンド トロンボシス、オックスフォード、ブラックウェル科学、第657-750頁、1976年に記述されているように凝血終点の検出に使用した。フィブリノーゲンは、K.ジェイコブソンら、スカンジナビアン ジャーナル オブ クリニカル アンド ラボラトリーアインベスティゲイションズ、7卷(増刊14号)、第9-54頁、1955年、に述べられている純血蛋白法により測定した。

ヘパリン及びPPACKの血漿活性レベルはそれぞれ3.8%クエン酸ナトリウム及びACD中に採取した血液サンプルにおいて測定した。サンプルは採取後即ちに遠心し(2000 × g、5分)、回収血漿はアッセイまで凍結しておいた。ヘパリン及びPPACKの活性レベルは連続点滴の30分及び60分後に測定した。いくつかの実験においてはPPACKレベルを3部位、すなわち、i) 全身性、ii) 該透析器の接吻合部からPPACK点滴部位の遠位、及びiii) 該透析器の接吻合部、について測定した。ヘパリン活性レベルは合成発色基質(スタクロムヘパリン、スタゴ、フ

ラス)を用いてヘパリンの血漿抗Xa活性増強作用を測定することにより決定した(ティーエンら、トロンボリサーチ、10卷、第399-410頁、1977年)。PPACKレベルは標準トロンビン試薬(ウシトロンビン、バーケーディビス、モリス ブレイズ、ニュージャージー州)を用いて抗トロンビン活性を測定することにより決定した。該結果は自己由来のヒビACD血漿について得られたPPACK換算曲線から $\text{Mg}/\text{mL}$ で表わされた。

血小板凝集はクエン酸添加の標血小板血漿(PRP)についてクロノログ血小板凝集計(ハーバータウン、ペンシルバニア州)を用いて37°CにおけるPRPの搅拌懸濁液中の光透過度の増加を記録することにより行なった。クエン酸濃度は0.12Mに一定に保たれ、PRPの血小板数は250,000血小板/ $\mu\text{L}$ に調整した。該結果はマルバスラ、ブラッド、57卷、第736-40頁、1981年に報告されたようにコラーゲン(ホルモンケミイ、ミュンヘン)及びADP(シグマ ケミカル社、セントルイス、モンタナ州)によって誘導されるEC<sub>50</sub>(50%最大凝集反応をもたらす作用物質濃度)により表わした。

ヘパリン及びPPACKの凝血に対する効果を比較するにあたり、該APTTを同等に延長させるような用量を選択した(表5)。ヘパリンにおいては、100 U/kgの初回投与及びその後の15 U/kg/時の速度の連続点滴(これは1.06 ± 0.08 U/kgの血漿レベルに相当する)による該透析器への血液循環期間中を通じて、全身血でのAPTTは1.99 ± 1.8秒に延長された。PPACKにおいては、該透析器の近位に100 ng/kg/分の速度で点滴(これは1.52 ± 0.06 μg/kgの全身血漿レベルに相当する)した場合、静脈血でのAPTTは1.39 ± 2.3秒に延長された。PPACKは血漿中のFPA、フィブリノーゲンのト

ロンビン開裂産物、のレベルの上昇を妨げたが、ヘパリンは妨げなかった（表 5）。

表 5  
ヘパリン及びPPACK の抗凝血作用の比較

血清測定	対照	ヘパリン	PPACK
APTT (秒)	34±1	199±18	139±23
ヘモ (単位/mM)	-	1.1±0.08	-
PPACK (μg/ml)	-	-	1.5±0.06
FPA (pmoL/L)	6.2±0.68	9.2±3.1	1.8±0.20
TGTT-TG (mg/dL)	403±24	387±32	344±14.0

PPACKは透析器内に直接注入され、導管からの除去が迅速であったため、本薬剤の該装置内レベルは全身濃度よりも実質的に高かった（表 6）。

表 6

全身レベルと比較した中空線維透析器直前  
及び直後の血漿中PPACK濃度

サンプル部位	血漿中PPACK(μg/ml)	
	時間(分)	
	3.0	6.0
全身	1.4±0.40	1.6±0.50
透析器前	3.05±0.55	3.65±0.65
透析器後	3.9±0.50	4.1±1.20

て使用した（第8図）。ヘパリン処置動物は全試験時間についてDFVの有意かつ漸進的低下及び該線維束内の血小板蓄積の相反する増加を示した。対照的に、PPACK処置により該透析器内の血小板蓄積が著しく減少するとともにDFVが保たれた。

透析器使用中の補体活性化(C3a)若しくは白血球数減少に関するヘパリン及びPPACK治療の間に明白な差は見られなかった。C3aレベルは7.69±2.02ng/mlの対照値から、ヘパリン及びPPACKのそれぞれについて2.005±7.28ng/ml及び1.989±3.60ng/mlのピークレベルまで上昇した。逆に、白血球数には対照値からの早期の低下が観察された(14,100±1,000細胞/μlからヘパリンが6,200±860細胞/μl、PPACKが5,900±810細胞/μl)。

本実験結果及びパートAの結果はヘパリンによる抗凝血対照実験の知見とは対照的に血液透析中の合成抗トロンビン剤PPACKの点滴が血小板依存性血栓形成及びその結果生じる該血液透析器の中空線維束容積の損失を、著しく減少させることを明らかにしている。さらに、インビオの血栓形成の他の間接的血液指標、すなわち血漿PF4、BTG及びFPAは、ヘパリン療法中に観察されたレベルの上昇とは対照的にPPACK注入後も基準レベルを維持した。PPACKはまた、エクスピオのコラーゲン若しくはADPによって誘導される血小板蓄積の測定値を変化させずに、出血時間の延長によって示される血小板の止血プラグ形成を阻害したが、ヘパリンは阻害しなかった。これらの結果は、透析器中空線維の漸進的損失が血小板依存性で、トロンビンが介在する閉塞性血栓症過程であることの証拠を提供するものである。

中空線維透析器による血液透析は米国では長期透析を受けた尿毒症患者に用いられている。透析器再利用における機能の保

血小板反応性を全血小板数、出血時間、血小板蓄積、及び血小板特異性α颗粒蛋白BTG及びPP4を比較することにより評価した(表7)。血小板数はヘパリン若しくはPPACKの投与期間中の透析器通過中有意に変化しなかったが、血小板止血作用に関しては有意の差が明らかになった。PPACKは出血時間を著しく延長し、PP4及びBTGの血小板から血漿中への放出を減少させた；ヘパリンはこれらの測定値のいずれにも影響を及ぼさなかった(表7)。1.00nmol/kg/分のPPACKを投与された5匹の個々の動物について行なわれたADP若しくはコレーゲンによる血小板蓄積は本質的に正常であった(表7)。

表 7

## 血小板におけるヘパリン及びPPACKの作用

測定	対照	ヘパリン	PPACK	差
血小板数( $\times 10^9/\mu\text{l}$ )	449±90	420±28	401±17	>0.5
出血時間(分)	4.5±0.4	6.7±1.2	24.8±1.9	>0.001
BTG(ng/ml)	8.2±1.0	20.7±6.8	4.5±0.7	<0.01
PP4(ng/ml)	13.5±2.4	23.7±6.6	11.5±5.7	<0.01
血小板蓄積(EC <sub>50</sub> ) ADP(μmol/L)	2.35	—	—	2.8
コレーゲン(μg/ml)	1.9	—	—	3.15

透析器線維束容積(DFV)及び該線維束内の<sup>111</sup>In-血小板沈着を各使用後の該透析器中の血栓形成の独立の測定項目とし

存は、経済的理由からのみならず、装置の再利用に伴ない死亡率及び機率が低下することを示している最近の疫学的研究の視点からも重要とみなされるようになっている(ボクら、プロシーディングスオブカウンセルダイアリティックトランステント、10巻、第92-9頁、1980年)。しかしながら、ヘパリンによる凝血防止にもかかわらず、該透析器の人工表面への血液の接触は補体、血小板及び凝血を活性化させ、その結果一過性の軽中等度、血栓形成及び、DFV及びそれに続く透析器輸送機能の漸進的損失をもたらす(ケノウイズら、アーティフィシャルオーガンズ、11巻、第155-62頁、1987年；E.ザルツマン、フェデラルプロシーディングス、30巻、第1503-09頁、1971年；及びブローマンら、フェデラルプロシーディングス、30巻、第1494-502頁、1971年)。さらに、血液-表面相互作用の結果として生じる活性化及び/又は開裂産物は血圧降下及び呼吸障害等の不都合な全身作用をもたらしかねない(ヘンダーソンら、ブラッドピュリフィケイション、1巻、第3-8頁、1985年；及びダンジラダスら、キドニーインターナショナル(Kidney Int.)、1巻、第190-96頁、1972年)。ヘパリン使用に伴なう他の副作用には腎機能障害の異常出血(特に腎臓部及び頭蓋内部)【リンドセイラ、ランセット、2巻、第1287-90頁、1972年；ダンジラダスら、キドニーインターナショナル(Kidney Int.)、1巻、第190-96頁、1972年】、とヘパリン誘導性血小板減少症(サイネスら、ニューアーヴィングラントジャーナルオブメディシン、303巻、第788-95頁、1980年)、及びともすれば重症の股石灰質性骨疾患が含まれる(スクワイアズら、JAMA、241巻、第2417-18頁、1979年；及びJ.グロフキ、

ライフサイエンス、33巻、第1019-24頁、1983年)。さらに、透析の終了時にヘパリン抗凝血作用を取り消すために投与されるプロタミンもまた、血圧降下及び補体放出等の問題をもたらす(アンダーソンら、サージェリィ、46巻、第1050頁、1959年、及びP. G. ルーブサー、テキサス ハート ジャーナル、14巻、第369-73頁、1987年)。透析、市販のヘパリンには、おそらく何らかの混入血小板活性化蛋白(類)の作用による動脈血栓症が伴なうことがあった(ザルツマンら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション、65巻、第64-73頁、1980年)。

PACKはその分子サイズの小ささゆえに腎臓から(T<sub>1/2</sub>除去速度:3分以内、コレラ、ジャーナル オブ ラボラトリイ アンド クリニカル メディシン、99巻、第76-83頁、1982年)及びおそらく透析膜を選しての両方により迅速に除去されるため、全身性の抗止血作用はほとんどあるいは全くないに、透析器内に局所的に抗血栓症レベルを維持することが可能である。たとえば、本実験では100 nmol/kg/分を投与した際の、該透析器中の血漿抗凝血剤活性の測定値は、全身レベルと比較すると著しく上昇した(表7)。実際の透析条件下では、PACKも透析液体に除去されるため、この差はさらに顕著になると思われる。このように、結果として生じる止血の困難はヘパリンと比較するとごく小さい。ヘパリンは完全に安全若しくは有効というわけではないが、適当な代替品が得られなかったため、透析患者に使用され続けている。本発明は従って、血液透析を実施する際の改善された方法を提供するものである。

前記の内容は本発明の実例を示すことを意図しているが、限定するものではない。

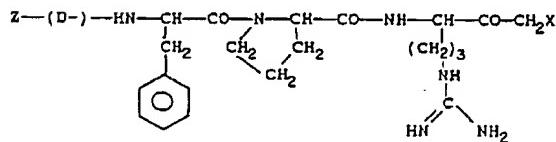


FIG. 1

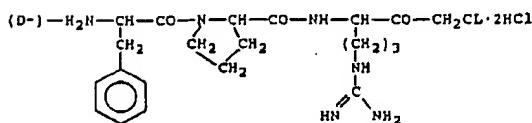


FIG. 2

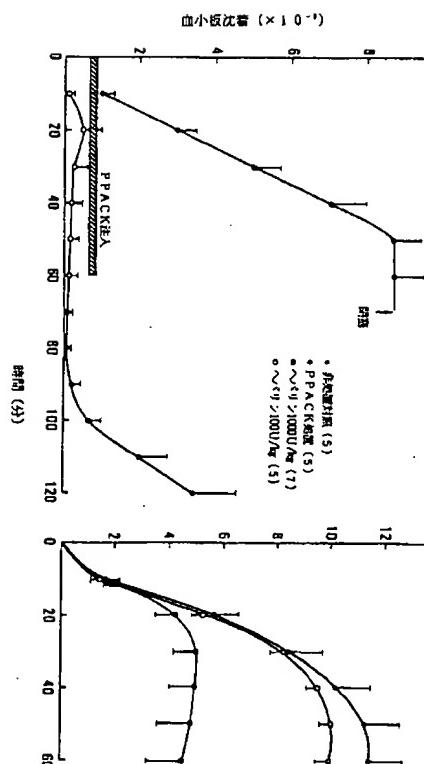


FIG. 3A

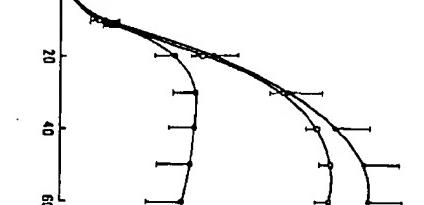


FIG. 3B

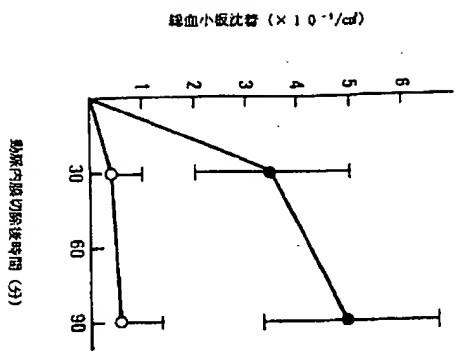


FIG. 4A

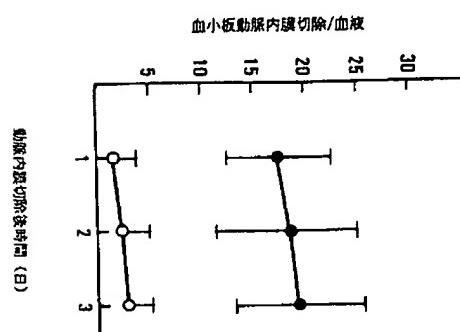


FIG. 4B

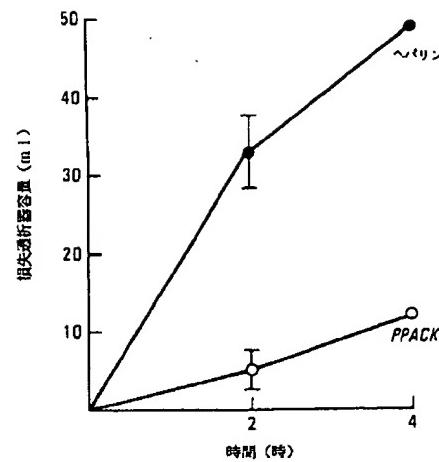


FIG. 5

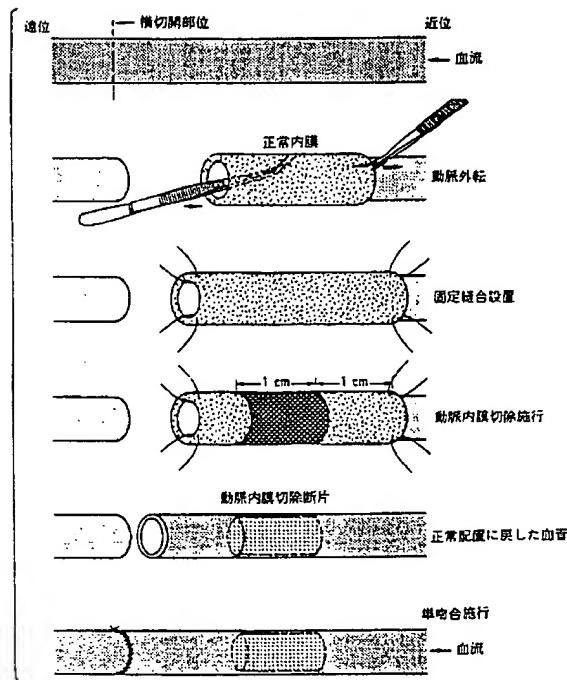


FIG. 6

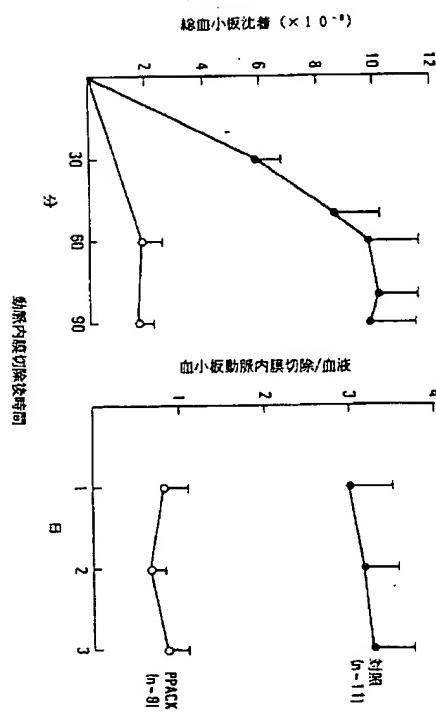


FIG. 7A

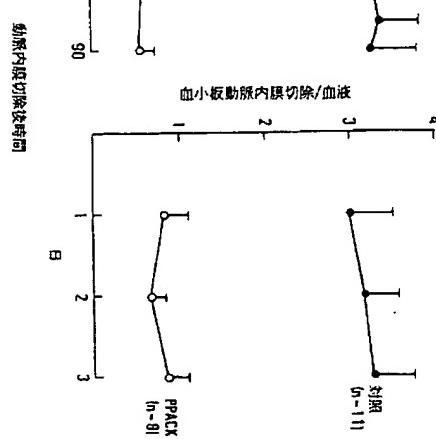


FIG. 7B

## 国際検索報告

I. CLASSIFICATION OF THE INVENTION (including Classification Number, Index, and IPC)		PCT/US88/04210
Assigning of International Patent Classification (IPC) or a Non-Standard Classification and IPC		
IPC(4): A61K 37/02; C07K 5/08		
U.S. CL.: 530/331; 514/18		
II. FIELD SEARCHED		
Indicate Documentations Searched / Classification System		
Classification System	Classification System	
U.S.	530/331	514/18
Documentation Search other than Minimum Documentation to the Extent that such Documentations are Included in the Filed Search		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Content of Document, if available, where available, of the relevant document	Reference in Class No.
X	US, A. 4,218,904 (BRAW) 09 March 1982 See entire document.	1-2 3-24
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the Invention Search	Date of Issue of the Correspondence Report	
15 May 1989	17 MAY 1989	
Independent Searching Assistant	Signature of Authorized Officer	
ISA/US	LESTER L. LEE	

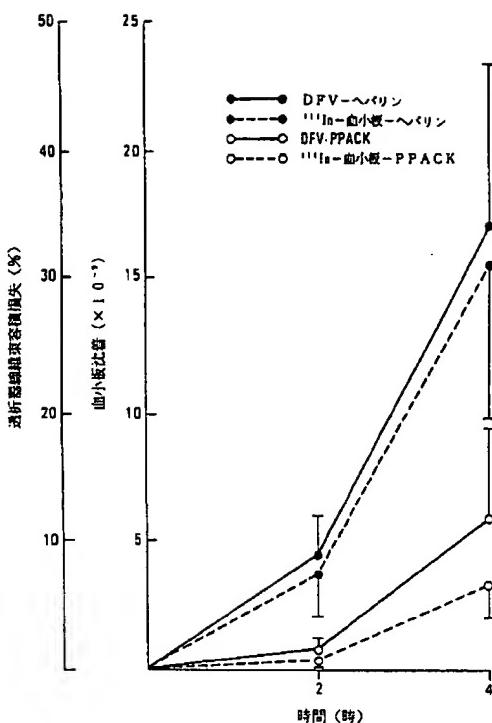


FIG. 8

第1頁の続き

優先権主張

②1988年11月22日③米国(U.S.)④275,330

⑤発明者

ハンソン スティーヴン アー  
— アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92024 エンシニタス メド  
ル  
— ヴィスタ レーン 201

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成8年(1996)6月25日

【公表番号】特表平4-501848

【公表日】平成4年(1992)4月2日

【年通号数】

【出願番号】特願平1-503265

【国際特許分類第6版】

A61K 38/00 ABX

38/46 ACB

【F1】

A61K 37/02 ABX 9455-4C

37/54 ACB 9455-4C

手 案 换 正 書

7.11.16

平成 年 月 日

1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。

2. 明細書第14頁17行及び19行の「アテロース」を各々「アテローム」と  
訂正する。

特許庁長官 清川佑二 殿

1. 事件の表示 平成1年特許第503265号

2. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ  
ラウンジーション

3. 代理人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
電話(代)3211-8741

氏 名 (5905)弁理士 中 村 稔

4. 補正命令の日付 自 発

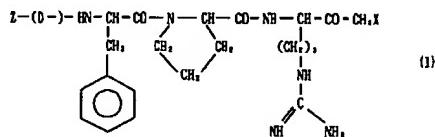
5. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「2」  
となりました。)

6. 補正の対象 明細書及び請求の範囲の欄

7. 補正の内容

附录の範例

1. 下式(1)で表わされるペプチド又はその中性の医薬上許容される塩を含むことを特徴とする血小板依存性動脈血栓症を予防する医薬組成物。



(式中、Zは水素若しくはC<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>アシル基を示し、Xはハロゲン原子を示す)。

2 Xが塩素であり、Zが水素である請求の範囲第1項記載の組成物。